

DE00/01873

EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 26 068.0

Anmeldetag: 8. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Arne Skerra, Freising/DE

Bezeichnung: Muteine des Bilin-Bindungsproteins

IPC: C 07 K, C 12 N und C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Seiler

Prof. Dr. Arne Skerra
Max-Lehner-Str. 18
85354 Freising

Tel.: 08161/71-4351
Fax: -4352



Mutene des Bilin-Bindungsproteins

=====

Zusammenfassung: "Muteine des Bilin-Bindungsproteins"

Die Erfindung bezieht sich auf Muteine des Bilin-Bindungsproteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusionsproteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Biomolekülen. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag, (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist. Aufgrund ihres einfachen molekularen Aufbaus weisen die erfindungsgemäßen Muteine bei Herstellung und Verwendung Vorteile im Vergleich zu Antikörpern gegen die Digoxigenin-Gruppe auf.

"Muteine des Bilin-Bindungsproteins"

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Muteine des Bilin-Bindungs-
 proteins mit Bindungsfähigkeit für Digoxigenin sowie Fusions-
 proteine solcher Muteine, Verfahren zur Herstellung derartiger
 Muteine und ihrer Fusionsproteine sowie deren Verwendung zum
 10 Nachweis oder zur Bindung von mit Digoxigenin markierten Bio-
 molekülen.

Die Digoxigeningruppe ist ein heute in der Molekularbiologie
 weit verbreitetes Instrument für den nichtradioaktiven Nach-
 weis von Nukleinsäuren, Proteinen und anderen Biomolekülen. Zu
 15 diesem Zweck wird das Biomolekül mit einem reaktiven Derivat
 des Digoxigenins meist kovalent modifiziert, was den an-
 schließenden Nachweis des Moleküls mit einem gegen die Digoxi-
 geningruppe gerichteten Antikörper, bzw. einem Konjugat aus
 einem entsprechenden Antikörperfragment und einem Reporter-
 20 enzym, gemäß in der Biochemie allgemein üblichen Methoden ge-
 stattet.

Dem Fachmann sind eine ganze Reihe von reaktiven Digoxigenin-
 derivaten bekannt, die teilweise auch kommerziell erhältlich
 25 sind, Beispielsweise eignen sich Digoxigenin-3-O-methyl-
 carbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (DIG-
 NHS), Digoxigenin-3-O-succinyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxy-
 succinimidester und 3-Amino-3-desoxydigoxigenin-hemisuccin-
 amid-succinimidylester zur kovalenten Kopplung mit Proteinen,
 30 insbesondere mit den Aminogruppen von exponierten Lysinseiten-
 ketten. Mit 3-Iodacetyl-amino-3-desoxydigoxigenin lassen sich
 vor allem Thiolgruppen in Proteinen oder anderen Biomolekülen
 selektiv mit der Digoxigeningruppe markieren. Synthetische
 Oligodesoxynukleotide können mit denselben reaktiven Digoxi-
 35 geninderivaten gekoppelt werden, sofern sie im Verlauf der
 Synthese mit geeigneten freien Amino- oder Thiolgruppen verse-
 hen wurden.

Zur direkten Markierung von Nukleinsäuren eignen sich zudem cis-Platinkomplexe von Digoxigeninderivaten (DIG Chem-Link Reagent) oder Carbodiimidgruppen enthaltende Digoxigeninderivate (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 806 431 A2). Alternativ ist es im Fall von Desoxyribonukleinsäuren möglich, diese im Verlauf einer matrizenabhängigen enzymatischen Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase und eines mit der Digoxigeningruppe gekoppelten Desoxynukleosidtriphosphats, z. B. Digoxigenin-11-dUTP, Digoxigenin-11-ddUTP oder Digoxigenin-16-dATP, zu markieren. Analog eignet sich Digoxigenin-11-UTP zum Einbau in enzymatisch synthetisierte RNA. Darüber hinaus können Oligodesoxynukleotide direkt bei der automatisierten DNA-Synthese unter Einsatz geeigneter aktivierter Bausteine, z. B. sogenannter "Virtual Nucleotides", mit der Digoxigeningruppe markiert werden. Derartige mit der Digoxigeningruppe gekoppelte Nukleinsäuren eignen sich als nichtradioaktive Sonden zum Nachweis komplementärer Nukleotidsequenzen durch Hybridisierung, z. B. in Northern oder Southern Blots (offenbart in der europäischen Patentveröffentlichung EP 0 324 474 A1).

Mit der Digoxigeningruppe markierte Proteine oder Glycoproteine sind insbesondere von Nutzen, um beispielsweise entsprechende Antigene bzw. dagegen gerichtete Antikörper in immunchemischen Testverfahren wie ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zu bestimmen. Der eigentliche Nachweis des mit der Digoxigeningruppe konjugierten Biomoleküls erfolgt normalerweise mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, in der Regel in der Form eines Konjugats aus dem Fab-Fragment dieses Antikörpers mit einem geeigneten Enzym, wie z. B. der Alkalischen Phosphatase oder der Meerrettich-Peroxidase, als Markierung. Die enzymatische Aktivität dient anschließend zur Quantifizierung durch Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder chemolumineszenten Reaktion. Verschiedene Antikörper gegen die Digoxigeningruppe sind bekannt (Mudgett-Hunter et al., J. Immunol. 129 (1982), 1165-1172; Jeffrey et al., J. Mol. Biol. 248 (1995), 344-360).

Die Verwendung von Antikörpern hat jedoch mehrere Nachteile. So ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in Hybridomzellkulturen aufwendig, und die Proteolyse zum Fab-Fragment sowie die Produktion von Konjugaten mit Reporterenzymen erfordert zusätzliche schwierige Verfahrensschritte. Aber selbst die gentechnische Gewinnung von Antikörpern ist nicht einfach, was hauptsächlich darin begründet ist, daß sich Antikörper wie auch deren antigenbindende Fragmente in strukturell komplizierter Weise aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzen. Bei der gentechnischen Manipulation von Antikörpern müssen deshalb zwei Gene gleichzeitig gehandhabt werden. Außerdem ist die Ausbeute an korrekt gefalteten Antikörperfragmenten bei deren gentechnischer Produktion häufig gering. Wie dem Fachmann bekannt ist, gilt dies umso mehr, wenn rekombinante Fusionsproteine aus Fab-Fragmenten von Antikörpern und Enzymen hergestellt werden sollen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, alternative Polypeptid-Reagenzien zum Nachweis der Digoxigeningruppe zu entwickeln, welche sich auf einfache Weise produzieren lassen.

In einem evolutiven Forschungsansatz wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß sich Muteine des strukturell aus einer einzigen Polypeptidkette aufgebauten Bilin-Bindungsproteins (Schmidt und Skerra, Eur. J. Biochem. 219 (1994), 855-863) eignen, um die Digoxigeningruppe durch Bindung mit hoher Affinität nachzuweisen, wobei die Erkennung des Digoxigenins erstaunlich selektiv gegenüber anderen Steroiden erfolgt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es

- (a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
- (b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
- (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.

Außerhalb des Bereichs der Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 können die Muteine der vorliegenden Erfindung der Aminosäuresequenz des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* entsprechen. Andererseits kann die Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen Polypeptide auch außerhalb der genannten Positionen Unterschiede zum Bilin-Bindungsprotein aufweisen. Derartige Varianten der Sequenz des Bilin-Bindungsproteins umfassen natürlich vorkommende sowie künstlich erzeugte Varianten, und unter den Abweichungen werden Substitutionen, Insertionen, Deletionen von Aminosäureresten sowie N- und/oder C-terminale Additionen verstanden.

Z. B. können die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins Aminosäuresubstitutionen aufweisen, welche eine Oligomerisierung des Bilin-Bindungsproteins vermeiden, wie die Substitution Asn(1)->Asp, oder um eine proteolytische Spaltung innerhalb der Polypeptidkette zu unterdrücken, die bei der Produktion in *E. coli* auftreten kann, z. B. durch die Substitution Lys(87)->Ser. Weiterhin können in die für die Muteine des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure die Mutationen Asn(21)->Gln und Lys(135)->Met eingeführt werden, um beispielsweise die Klonierung eines Genabschnitts über zwei neue BstXI-Restriktionsschnittstellen an diesen Positionen zu erleichtern. Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung die gezielte Einführung von Aminosäuresubstitutionen innerhalb oder außerhalb der genannten Positionen, um ganz allgemein bestimmte Eigenschaften des erfindungsgemäßen Muteins zu verbessern, z. B. seine Faltungsstabilität oder -effizienz oder seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Proteasen.

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Polypeptide, Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden, kann durch übliche Verfahren, z. B. ELISA, Fluoreszenztitration, Titrationskalorimetrie, Oberflächen-Plasmonresonanzmessungen oder Blotting-Verfahren, beispielsweise Western-Blotting, Southern-Blotting oder Northern-Blotting, bestimmt werden. Blotting-Methoden können verwendet werden, um Konjugate des Digoxigenins mit

Proteinen oder Nukleinsäuren auf eine Membran zu transferieren und diese anschließend mit einem der erfindungsgemäßen Muteine, einem Konjugat dieses Muteins oder einem Fusionsprotein dieses Muteins nachzuweisen.

5

Eine quantitative Kenngröße für die Bindungsaffinität liefern etablierte thermodynamische Parameter, wie etwa die Affinitätskonstante oder die Dissoziationskonstante für den Komplex aus dem Mutein und dem gebundenen Liganden, z. B. Digoxigenin.

10 Aber auch eine qualitative Bestimmung der Bindungsfähigkeit ist möglich, z. B. anhand der Intensität eines Bindungssignals aufgrund einer chromogenen Reaktion bzw. eines Farbniederschlags, welcher mit Hilfe einer der genannten Blotting-Methoden erhalten wird.

15

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine werden in einem zweistufigen evolutiven Prozeß erhalten. Die Zufallsmutagenese des Bilin-Bindungsproteins und wiederholte Selektion von Muteinen mit Affinität zur Digoxigeningruppe aus dieser Bibliothek, wo-

20 bei freies Digoxigenin zur kompetitiven Anreicherung verwendet wird, liefert Muteine des Bilin-Bindungsproteins, die die Digoxigeningruppe erkennen, wobei aber die Affinität noch vergleichsweise niedrig ist. Die erneute Mutagenese eines solchen Muteins an den Aminosäurepositionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37, nun gefolgt von einer wiederholten Anreicherung durch Komplexbildung mit der Digoxigeningruppe und anschließender Dissoziation des gebildeten Komplexes im sauren Milieu, führt daraufhin zur Gewinnung von Muteinen mit wesentlich höherer Affinität zur Digoxigeningruppe.

25
30

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die Affinitätskonstante zwischen solchen erfindungsgemäßen Polypeptiden und Digoxigenin mindestens 10^7 M^{-1} beträgt. Anders ausgedrückt heißt dies, daß die Dissoziationskonstante des Komplexes aus dem erfindungsgemäßen Polypeptid und Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist. Einzelne Exemplare zeigen sogar Dissoziationskonstanten von 35 nM oder kleiner, wie in den Beispielen ausgeführt ist.

35

Neben dem Digoxigenin können von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins auch Derivate des Digoxigenins als Ligand gebunden werden, z. B. Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin. Weiterhin können Konjugate dieser chemischen Verbindungen, d. h. mit Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin kovalent oder über einen Metallkomplex verknüpfte Nukleinsäuren, Polypeptide, Kohlenhydrate, andere natürliche oder synthetische Biomoleküle, Makromoleküle oder niedermolekulare Verbindungen, von den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins gebunden werden. Vorzugsweise werden zur Herstellung solcher Konjugate die dem Fachmann bekannten reaktiven Derivate von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin eingesetzt, wie sie beispielsweise weiter oben angegeben sind.

Bevorzugte erfindungsgemäße Muteine, welche durch den beschriebenen zweistufigen Prozeß gewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu Digoxigenin eine noch höhere Affinität zu Digitoxin oder Digitoxigenin, deren Steroidsystem sich bloß durch das Fehlen einer Hydroxygruppe von dem des Digoxigenins unterscheidet. Überraschenderweise zeigen diese Muteine eine ausgeprägte Spezifität in Bezug auf die Digoxigenin- bzw. Digitoxigeningruppe, was sich darin ausdrückt, daß andere Steroide oder Steroidgruppen wie Ouabain oder Testosteron mit sehr viel geringerer Affinität, falls überhaupt, gebunden werden. Auch Derivate des Fluoresceins, wie 4-Aminofluorescein, werden offensichtlich nicht gebunden. Damit ist gemeint, daß Ouabain, Testosteron oder 4-Aminofluorescein jeweils eine Dissoziationskonstante von mindestens 10 μM , bevorzugt mindestens 100 μM , gegenüber den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins aufweisen.

In dieser Spezifitätseigenschaft unterscheiden sich diese Muteine erheblich von anderen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins sowie von gegen die Digoxigeningruppe gerichteten Antikörpern, wie z. B. dem Antikörper 26-10 (Chen et al., Protein Eng. 12 (1999), 349-356), welcher Ouabain mit beträchtlicher Affinität bindet, was den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins einen besonderen Vorteil verleiht. Es

ist überraschend, daß gerade die zusätzlichen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 28, 31, 34, 35, 36 und 37 zu den bevorzugten Muteinen des Bilin-Bindungsproteins führen. Bevorzugt sind daher solche Muteine, die mindestens eine oder alle
5 der Aminosäuresubstitutionen Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile und Glu(37)->Thr tragen.

Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Muteine tragen mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus
10 Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp, Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg, His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und
15 Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein. Bei der gewählten Schreibweise ist jeweils zunächst die Aminosäure in dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein (SWISS-PROT Datenbank-Zugriffscod P09464) zusammen mit der Sequenzposition für das mature Polypeptid in Klammern angegeben, und die entsprechende
20 Aminosäure in einem erfindungsgemäßen Mutein ist nach dem Pfeil genannt. Nochmals besonders bevorzugte Muteine gemäß dieser Erfindung tragen alle der genannten Aminosäuresubstitutionen.

Es ist überraschend, daß die Position 93 des Bilin-Bindungsproteins in den erfindungsgemäßen Muteinen nicht verändert ist, obwohl auch diese Aminosäure von der Mutagenese zur Herstellung der Zufallsbibliothek betroffen war. Bevorzugte Muteine des Bilin-Bindungsproteins tragen daher an dieser Position die Aminosäure Val.
25
30

Für bestimmte Nachweisverfahren ist es günstig, die Muteine des Bilin-Bindungsproteins der vorliegenden Erfindung in markierter Form zu verwenden. Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Polypeptid, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es zumindest eine Markierung trägt. Geeignete Markierungsgruppen sind dem Fachmann bekannt und umfassen Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumines-
35

zenzmarkierung oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold. Ganz allgemein ist die Markierung mit Substanzen bzw. Enzymen möglich, die in einer chemischen oder enzymatischen Reaktion einen bestimm-
 5 baren Stoff erzeugen. Dabei können alle für Antikörper bekannten Markierungen auch an die erfindungsgemäßen Muteine gekoppelt werden.

Eine für die praktische Anwendung besonders vorteilhafte Mög-
 10 lichkeit besteht darin, die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins in der Form von Fusionsproteinen zu verwenden. Techniken zur Herstellung solcher Fusionsproteine mittels gentechnischer Methoden sind dem Fachmann bekannt. Ge-
 eignete Fusionspartner für die erfindungsgemäßen Muteine wären
 15 Enzyme und andere Polypeptide, Proteine oder Proteindomänen. Derartige Fusionen wären geeignet, um dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins zusätzliche Eigenschaften zu vermitteln, wie z. B. enzymatische Aktivität oder Affinität zu anderen Molekü-
 len, wie Proteinen, Makromolekülen oder niedermolekularen Li-
 20 ganden.

Beispielsweise sind Fusionen mit Enzymen, welche chromogene oder fluorogene Reaktionen katalysieren oder zur Freisetzung von cytotoxischen Agenzien dienen können, möglich. Weitere
 25 Beispiele für Fusionspartner, die in der Praxis von Vorteil sein können, sind Bindungsdomänen wie die Albumin-Bindungsdomäne oder die Immunglobulin-Bindungsdomäne von Protein G oder Protein A, Antikörperfragmente, Oligomerisierungsdomänen, Toxine oder andere Bindungsproteine und deren funktionelle Be-
 30 standteile sowie Affinitätspeptide, wie z. B. das Strep-Tag oder das Strep-Tag II (Schmidt et al., J. Mol. Biol. 255 (1996), 753-766). Auch Proteine mit besonderen chromogenen oder fluorogenen Eigenschaften, wie z. B. das grün fluoreszierende Protein, eignen sich als Fusionspartner. Weiterhin käme
 35 das Hüllprotein III eines filamentösen Bakteriophagen, wie M13, f1 oder fd, oder ein Fragment dieses Hüllproteins als Fusionspartner in Frage.

Unter dem Begriff Fusionsproteine sollen hier ganz allgemein auch solche erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins verstanden werden, die mit einer Signalsequenz ausgestattet sind. Signalsequenzen am N-Terminus des erfindungsgemäßen Polypeptids können dazu dienen, dieses bei der Biosynthese in ein bestimmtes Zellkompartiment, z. B. das Periplasma von *E. coli* oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle, bzw. in das die Zelle umgebende Medium zu dirigieren. Dabei wird die Signalsequenz normalerweise von einer Signalpeptidase abgespalten. Außerdem können andere Signal- bzw. Targeting-Sequenzen verwendet werden, die nicht unbedingt am N-Terminus des Polypeptids angebracht sein müssen, und die dessen Lokalisierung in speziellen Zellkompartimenten ermöglichen. Eine bevorzugte Signalsequenz zur Sekretion in das Periplasma von *E. coli* ist die OmpA-Signalsequenz. Weitere Signalsequenzen sowie Targeting-Sequenzen sind im Stand der Technik in großer Zahl bekannt.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins besteht darin, daß sich sowohl deren N-Terminus als auch deren C-Terminus zur Herstellung von Fusionsproteinen eignet. Im Gegensatz zu Antikörpern, bei denen sich der N-Terminus sowohl der leichten als auch der schweren Immunglobulinkette in räumlicher Nähe zur Antigenbindungsstelle befinden, können bei den erfindungsgemäßen Polypeptiden beide Enden der Polypeptidkette zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, ohne daß die Bindung des Liganden beeinträchtigt wird.

Ein Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist. Ein nochmals weiterer Gegenstand der Erfindung sind Fusionsproteine von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins oder von Fusionsproteinen mit dem Aminoterminus von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins, wobei ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.

- Ein bevorzugtes Enzym zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Fusionsproteine ist die bakterielle Alkalische Phosphatase (Sowadski et al., J. Mol. Biol. 186 (1985) 417-433). Diese
- 5 kann einerseits am N-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins oder am C-Terminus eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins angebracht sein. Zusätzlich kann ein solches Fusionsprotein eine Signalsequenz tragen, wie z. B. OmpA oder PhoA, die dessen Sekretion in das Periplasma von *E. coli* be-
- 10 wirkt, wo sich die Disulfidbindungen in der Polypeptidkette effizient ausbilden können. Weiterhin kann es mit einem Affinitätspeptid ausgestattet sein, wie z. B. dem Strep-Tag II, welches dessen einfache Reinigung erlaubt. Spezifische erfindungsgemäße Fusionsproteine sind in den Beispielen beschrieben.
- 15 Ein Vorteil eines derartigen Fusionsproteins besteht darin, daß es direkt eine chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Nachweisreaktion katalysieren kann, was seinen Einsatz zur Detektion der Digoxigenin-Gruppe vereinfacht.
- 20 Ein weiterer Vorteil der Verwendung der Alkalischen Phosphatase zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine besteht darin, daß dieses Enzym zu einem stabilen Homodimer assoziiert und demzufolge dem Mutein des Bilin-Bindungsproteins als Bestandteil des Fusionsproteins die Eigenschaft der Bivalenz
- 25 verleiht. Auf diese Weise kann bei der Bindung der Digoxigenin-Gruppe ein Aviditätseffekt resultieren, der die Nachweisempfindlichkeit steigert. Ein solcher Aviditätseffekt ist insbesondere zu erwarten, wenn das mit Digoxigenin markierte Molekül an einer festen Phase adsorbiert ist, in oligomerer bzw.
- 30 membrangebundener Form vorliegt oder mit mehreren Digoxigenin-Gruppen konjugiert ist. Andere homodimere Enzyme eignen sich analog zur Herstellung bivalenter Fusionsproteine mit den erfindungsgemäßen Muteinen des Bilin-Bindungsproteins.
- 35 Abgesehen von der bakteriellen Alkalischen Phosphatase können auch Phosphatasen aus eukaryontischen Organismen, wie z. B. die kalbsintestinale Phosphatase (CIP), zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwendet werden. Diese zeichnen sich oftmals durch höhere enzymatische Aktivität aus (Murphy

und Kantrowitz, Mol. Microbiol. 12 (1994), 351-357), was eine größere Nachweisempfindlichkeit bewirken kann. Auch Mutanten der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit verbesserter katalytischer Aktivität (Mandecki et al., Protein Eng. 4 (1991), 801-804) lassen sich zur Konstruktion erfindungsgemäßer Fusionsproteine verwenden. Weiterhin eignen sich andere dem Fachmann bekannte Enzyme, welche chromogene, fluorogene oder chemolumineszente Reaktionen katalysieren, wie z. B. die β -Galactosidase oder die Meerrettich-Peroxidase, zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsproteine. All diese Enzyme können darüber hinaus ebenso zur Markierung von Muteinen des Bilin-Bindungsproteins eingesetzt werden, indem sie z. B. unter Verwendung üblicher Kopplungsreagenzien mit dem separat gewonnenen Mutein oder einem Fusionsprotein des Muteins konjugiert werden.

Unter einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine Nukleinsäure, die eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Sequenz umfaßt. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Vektors sein, auf dem eine operativ funktionelle Umgebung zur Expression der Nukleinsäure gegeben ist. Geeignete Vektoren sind in großer Zahl aus dem Stand der Technik bekannt und werden hierin nicht ausführlich beschrieben. Unter einer operativ funktionellen Umgebung werden solche Elemente verstanden, die die Transkription und/oder nachfolgende Prozessierung einer mRNA ermöglichen, begünstigen, erleichtern und/oder erhöhen. Beispiele für derartige Elemente sind etwa Promotoren, Enhancer, Transkriptionsinitiationsstellen und -terminationsstellen, Translationsinitiationsstellen, Polyadenylierungssignale etc.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ihre Umgebung kann dabei dergestalt sein, daß die Biosynthese des Polypeptids im Cytosol erfolgt, wobei der Polypeptidsequenz ggf. ein Start-Methionin vorangestellt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dagegen eine N-terminale Signalsequenz verwendet, insbesondere die OmpA- oder die PhoA-Signalsequenz, um das erfindungsgemäße Polypeptid in das Periplasma von *E. coli*

zu dirigieren, wo die Signalsequenz von der Signalpeptidase abgespalten wird und sich die Polypeptidkette unter oxidativer Ausbildung der Disulfidbindungen falten kann. Eukaryontische Signalsequenzen können Verwendung finden, um das erfindungsgemäße Polypeptid in einem eukaryontischen Wirtsorganismus zu sekretieren. Grundsätzlich kommen zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure sowohl prokaryontische, bevorzugt *E. coli*, als auch eukaryontische Zellen wie z. B. Hefen in Betracht.

10

Unter einem nochmals weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Muteins oder Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird. In der Regel wird dazu zunächst eine geeignete Wirtszelle mit einem Vektor, der eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäure umfaßt, transformiert. Die Wirtszelle wird dann unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Biosynthese des Polypeptids erfolgt, und das erfindungsgemäße Polypeptid wird gewonnen.

25

Bezüglich des Herstellungsverfahrens ist zu beachten, daß die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins zwei strukturelle Disulfidbindungen aufweisen, und daß in entsprechenden Fusionsproteinen ggf. zusätzliche Disulfidbindungen vorliegen. Die mit der Proteinfaltung einhergehende Ausbildung dieser Disulfidbindungen ist in der Regel gewährleistet, wenn das erfindungsgemäße Polypeptid mit Hilfe einer geeigneten Signalsequenz in ein Zellkompartiment mit oxidierendem Thiol/Disulfid-Redoxmilieu dirigiert wird, beispielsweise das bakterielle Periplasma oder das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums einer eukaryontischen Zelle. Das erfindungsgemäße Polypeptid läßt sich dabei durch Zellfraktionierung freisetzen oder aus dem Kulturüberstand gewinnen. Ggf. läßt sich die Faltungseffizienz durch Überproduktion von Protein-Disulfidiso-

35

merasen, wie z. B. dem DsbC-Protein von *E. coli*, oder von Faltungs-Hilfsproteinen steigern.

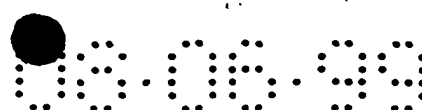
- Andererseits ist es möglich, ein erfindungsgemäßes Polypeptid
5 im Cytosol einer Wirtszelle, bevorzugt *E. coli*, zu produzieren. Es kann dann z. B. in Form von Einschlusskörpern gewonnen und anschließend *in vitro* renaturiert werden. Je nach Verwendungszweck kann das Protein mittels verschiedener dem Fachmann bekannter Methoden gereinigt werden. Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins eignet sich z.
10 B. die Affinitätschromatographie mit einem Säulenmaterial, welches Digoxigeningruppen trägt. Zur Reinigung von Fusionsproteinen der Muteine des Bilin-Bindungsproteins können die aus dem Stand der Technik bekannten Affinitätseigenschaften
15 des Fusionsproteins ausgenutzt werden, z. B. die des Strep-Tags oder des Strep-Tags II (Schmidt und Skerra, J. Chromatogr. A 676 (1994), 337-345; Voss und Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), die der Albumin-Bindungsdomäne (Nygren et al., J. Mol. Recogn. 1 (1988), 69-74) oder die der
20 Alkalischen Phosphatase (McCafferty et al., Protein Eng. 4 (1991) 955-961). Bei den Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide ist die Tatsache, daß die Muteine des Bilin-Bindungsproteins nur aus einer einzelnen Polypeptidkette bestehen, von Vorteil, da weder dafür zu sorgen ist, daß mehrere
25 verschiedene Polypeptidketten gleichzeitig innerhalb einer Zelle synthetisiert werden müssen, noch, daß unterschiedliche Polypeptidketten in funktioneller Weise miteinander assoziieren.
- 30 Die praktischen Anwendungsmöglichkeiten für die erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bindungsproteins entsprechen im wesentlichen denjenigen herkömmlicher Antikörper oder Antikörperfragmente mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin. Demnach betrifft die Erfindung auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des
35 Bilin-Bindungsproteins in einem Verfahren zum Nachweis, zur Bestimmung, zur Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digoxigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder syn-

thetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Muteine des Bilin-Bin-
5 dungsproteins oder ihrer Fusionsproteine in Nachweisverfahren
kann im wesentlichen analog zu den entsprechenden Nachweisver-
fahren erfolgen, die für Antikörper gegen Digoxigenin, sowie
deren Fragmente und/oder Konjugate, bekannt sind. Unter einem
weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung deshalb ein
10 Verfahren zum Nachweis der Digoxigeningruppe, wobei ein Mutein
des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Mu-
teins des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin oder mit Kon-
jugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine
Bindung des Muteins an die Digoxigeningruppe zu bewirken, in
15 Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des
Muteins bestimmt wird.

Zu diesem Zweck kann das Mutein direkt, z. B. durch kovalente
Kopplung, markiert sein. Aber auch indirekte Markierungen, z.
20 B. mittels markierter Antikörper gegen das Bilin-Bindungspro-
tein oder dessen Muteine oder gegen Domänen von Fusionsprotei-
nen dieser Muteine, können eingesetzt werden. Besonders vor-
teilhaft ist die Verwendung erfindungsgemäßer Fusionsproteine
mit einem Enzym, z. B. der Alkalischen Phosphatase, anstelle
25 eines markierten Muteins des Bilin-Bindungsproteins. In diesem
Fall läßt sich das Bestimmungsverfahren mit einer besonders
geringen Zahl von Verfahrensschritten gestalten, wobei z. B.
die Fähigkeit zur Katalyse einer chromogenen, fluorogenen oder
lumineszenten Nachweisreaktion durch das Enzym als Bestandteil
30 des Fusionsproteins unmittelbar ausgenutzt werden kann. Die
leichte Verfügbarkeit solcher Fusionsproteine stellt hierbei
einen besonderen Vorteil im Vergleich zu entsprechenden Fusi-
onsproteinen herkömmlicher Antikörper dar. Die Ausnutzung des
oben beschriebenen Aviditätseffekts im Fall eines oligomeren
35 Fusionsproteins stellt einen weiteren Vorteil bei einem sol-
chen Verfahren dar.

Ein Bestimmungsverfahren für die Digoxigeningruppe kann z. B.
qualitativ zum Nachweis von mit der Digoxigeningruppe konju-



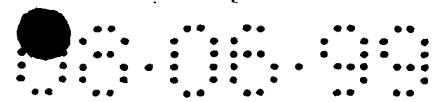
- gierten Nukleinsäuren in Southern- bzw. Northern-Blots oder von mit der Digoxigeningruppe konjugierten Proteinen in Western-Blots durchgeführt werden. Ein Bestimmungsverfahren kann auch quantitativ zum Nachweis von mit der Digoxigenin-
- 5 gruppe konjugierten Proteinen im ELISA durchgeführt werden. Zudem eignet sich ein erfindungsgemäßes Bestimmungsverfahren zum indirekten Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Proteinen oder anderen Molekülen unter Verwendung eines gegen das Protein oder Molekül gerichteten Bindungsproteins, z. B.
- 10 eines Antikörpers bzw. seines Fragments, welches mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist. Auch der indirekte Nachweis von nicht mit Digoxigenin konjugierten Nukleinsäuren unter Verwendung eines mit dieser Nukleinsäure hybridisierenden Gensonde, welche mit der Digoxigeningruppe konjugiert ist, ist möglich.
- 15 Eine Anwendung in der medizinischen Diagnostik oder Therapie ergibt sich zudem bei der Bestimmung von Digoxigenin, Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin, ohne daß diese Liganden mit einem anderen Molekül konjugiert sein müssen.
- 20 Die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine können auch zur Immobilisierung eines mit der Digoxigeningruppe konjugierten Moleküls verwendet werden. Diese Immobilisierung erfolgt vorzugsweise an mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen beschichteten Festphasen, wie etwa Mikrotiterplatten, Immunosticks, Mikrobeads aus organischen, anorganischen
- 25 oder paramagnetischen Materialien oder Sensoroberflächen.
- Dementsprechend können die erfindungsgemäßen Muteine oder deren Fusionsproteine ebenfalls zur Abtrennung von Digoxigenin,
- 30 Digoxin, Digitoxin oder Digitoxigenin oder eines mit einer dieser Verbindungen konjugierten Moleküls verwendet werden. In diesem Fall kommen neben den genannten Festphasen auch Säulenmaterialien zur Beschichtung mit den Muteinen oder ihren Fusionsproteinen in Betracht. Vorzugsweise kann diese Beschichtung
- 35 durch Kopplung mittels chemisch reaktiver Gruppen auf geeigneten Säulenmaterialien erfolgen. Derartig beschichtete Säulenmaterialien können zur Abtrennung von mit Digoxigeningruppen konjugierten Substanzen sowie ggf. von Komplexen aus solchen

Substanzen mit anderen Molekülen aus einer Lösung verwendet werden.

Beispielsweise können so Antigene aus einer Lösung abgetrennt werden, indem die Lösung mit Antikörpern versetzt wird, welche gegen die Antigene gerichtet und mit der Digoxigeningruppe konjugiert sind, und die erhaltene Lösung mit dem genannten Säulenmaterial unter Bedingungen in Kontakt gebracht wird, unter denen eine Komplexbildung zwischen den Digoxigeningruppen und einem erfindungsgemäßen Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder seinem Fusionsprotein erfolgt. Ggf. ist im Anschluß an eine solche Abtrennung auch eine Elution der mit Digoxigenin konjugierten Substanz möglich. Diese Elution kann durch Kompetition mit Digoxin, Digoxigenin, Digitoxin oder Digitoxigenin erfolgen sowie z. B. durch Absenkung oder Erhöhung des pH-Werts der Lösung. Bei einer kompetitiven Elution kann dabei die höhere Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Muteine zu Digitoxigenin oder Digitoxin im Vergleich zur Digoxigeningruppe in vorteilhafter Weise ausgenutzt werden. Auf diese Weise läßt sich eine mit Digoxigenin konjugierte Substanz isolieren oder reinigen.

Die Erfindung wird weiter veranschaulicht durch die nachstehenden Beispiele und die beigegeführten Zeichnungen, in denen:

- Figur 1 jeweils eine Fluoreszenztitration des mit dem Streptag II fusionierten Muteins DigA16 mit den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain wiedergibt;
- Figur 2 die Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B) zur Herstellung von Fusionsproteinen des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase schematisch darstellt;
- Figur 3 den quantitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase in einem ELISA demonstriert;



Figur 4 den qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen durch Fusionsproteine des Muteins DigA16 mit der Alkalischen Phosphatase auf einem Western-Blot zeigt.

5

Figur 1 zeigt die graphische Darstellung von Ergebnissen aus Beispiel 3, bei der eine 1 μ M Lösung des Muteins DigA16 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Steroide Digoxigenin (Quadrate), Digitoxigenin (Kreise) und Ouabain (Rauten) versetzt wurde. Die jeweiligen Proteinfluoreszenzintensitäten wurden bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm gemessen und gegen die aktuelle Gesamtkonzentration des Steroids im jeweiligen Ansatz aufgetragen. Die Datenpunkte wurden schließlich mittels nicht linearer Regression durch eine Ausgleichskurve angepaßt.

Figur 2 zeigt eine Zeichnung der Expressionsvektoren pBBP27 (A) und pBBP29 (B). pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase mit ihrer eigenen Signalsequenz, einem Peptid-Linker mit der Sequenz Pro-Pro-Ser-Ala, dem Mutein DigA16 sowie dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Das entsprechende Strukturgen wird von dem *dsbC*-Strukturgen (einschließlich dessen ribosomaler Bindungsstelle) aus *E. coli* (Zapun et al., Biochemistry 34 (1995), 5075-5089) als zweitem Cistron gefolgt. Das dadurch gebildete künstliche Operon steht unter gemeinsamer Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tetP^o$) und endet am Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}). Weitere Elemente des Vektors sind der Replikationsursprung (*ori*), die intergenische Region des filamentösen Bakteriophagen f1 (f1-IG), das für die β -Lactamase kodierende Ampicillin-Resistenzgen (*bla*) und das Tetracyclin-Repressorgen (*tetR*). pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, dem Mutein DigA16, dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel, einem Peptid-Verbindungsstück bestehend aus fünf Glycinresten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase ohne ihre N-terminale Aminosäure Arginin. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereiches sind mit dem Vektor pBBP27 identisch.

Figur 3 zeigt eine graphische Darstellung der Daten aus Beispiel 4, in dem der quantitative Nachweis von Digoxigeningruppen mit Hilfe der Fusionsproteine des Muteins DigA16 als Genprodukt der Vektoren pBBP27 (geschlossene Symbole) und pBBP29 (offene Symbole) geführt wurde. Hierbei waren die Digoxigeningruppen einerseits an Rinder-Serumalbumin (BSA, Quadrate) oder andererseits an Albumin aus Hühner-Ei (Ovalbumin, Dreiecke) gekoppelt. Als Kontrolle sind die Daten dargestellt, die bei der Verwendung von underivatisiertem Rinder-Serumalbumin sowie dem Fusionsprotein kodiert von pBBP27 erhalten wurden (offene Kreise). Die dem jeweiligen gebundenen Fusionsprotein entsprechende enzymatische Aktivität wurde anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) mittels der Gleichung

$$[P \cdot L] = [L]_t [P]_t / (K_d + [P]_t).$$

Hierbei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten Gesamtkonzentration des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \cdot L]$ wird anhand der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Die innerhalb einer Konzentrationsreihe konstante Gesamtkonzentration der Digoxigeningruppen $[L]_t$ je Vertiefung sowie die Dissoziationskonstante K_d wurden durch nicht lineare Regression als Parameter angepaßt.

Figur 4 zeigt das Ergebnis eines Western Blot-Experiments aus Beispiel 4 zum qualitativen Nachweis von mit Digoxigeningruppen konjugierten Biomolekülen mittels der von pBBP27 (Spuren 1 und 2) sowie von pBBP29 (Spuren 3 und 4) kodierten Fusionsproteine des Muteins DigA16. Zum Vergleich ist ein mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtes 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel der Biomoleküle ebenfalls dargestellt (Spuren 5 und 6). Hierbei wurde in den Spuren 1, 3 und 5 jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg underivatisiertem BSA, underivatisiertem Ovalbumin und underivatisierter RNaseA aufgetrennt. In den Spuren 2, 4 und 6 wurde jeweils ein Gemisch aus 0,5 µg mit Digoxigeningruppen gekoppel-

08.08.99

23

tem BSA, mit Digoxigeningruppen gekoppeltem Ovalbumin und mit Digoxigeningruppen gekoppelter RNaseA aufgetrennt.

Beispiele

Sofern nicht anders angegeben, wurden die dem Fachmann geläufigen gentechnischen Methoden, wie sie z. B. in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Press) beschrieben sind, verwendet.

Beispiel 1: Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins, Phagemidpräsentation und Selektion eines Muteins mit Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Herstellung einer Bibliothek für Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurden dessen Aminosäure-Sequenzpositionen 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 einer konzertierten Mutagenese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mehreren Schritten unterworfen. Die PCR-Reaktionen wurden zunächst in zwei getrennten Amplifizierungsschritten in einem Volumen von je 50 µl durchgeführt, wobei 10 ng pBBP20-Phasmid-DNA (SEQ ID NO:1) als Matrize sowie jeweils 25 pmol zweier Primer (SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 in einem Ansatz und SEQ ID NO:4 und SEQ ID NO:5 in einem zweiten Ansatz), welche nach der allgemein bekannten Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, eingesetzt wurden.

Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10xTaq-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % v/v Triton X-100), 3 µl 25 mM MgCl₂ und 4 µl dNTP-Mix (2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit Wasser wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet und in einem programmierbaren Thermostatisierblock für 2 min auf 94 °C erhitzt. Anschließend wurden 2,5 u Taq DNA-Polymerase (5 u/µl, Promega) zugegeben und 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C, 1,5 min bei 72 °C, gefolgt von einer Inkubation für 5 min bei 60 °C, durchgeführt. Die gewünschten Amplifizierungsprodukte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung des Jetsorb DNA Extraction Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers aus Low Melting Point Agarose (Gibco BRL) isoliert.

Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP20 ist mit der kodierte Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit einer Hexanukleotidsequenz, die durch Ligierung eines

5 XbaI-Überhangs mit einem dazu komplementären SpeI-Überhang erhalten wurde, und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75, dessen vollständige Nukleotidsequenz in der Offenlegungsschrift DE 44 17 598 A1 angegeben ist.

10

Der darauffolgende Amplifizierungsschritt wurde in einem 100 µl-Ansatz durchgeführt, wobei jeweils ca. 6 ng der beiden isolierten Fragmente als Matrize, je 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:7 sowie 1 pmol des Oligodesoxynukleotids SEQ ID NO:8 eingesetzt wurden. Die restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes wurden wie in den vorangegangenen Amplifizierungsschritten mit der doppelten Menge zugesetzt. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 55 °C, 1,5 min bei 72 °C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C. Das erhaltene

15 Fragment wurde erneut durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

20

Zur Klonierung dieses Fragments, welches die Bibliothek der Muteine in Form einer Mischung von Nukleinsäuren repräsentierte, wurde es zunächst mit dem Restriktionsenzym BstXI (New England Biolabs) nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des erhaltenen Nukleinsäurefragments (335 Basenpaare, bp) erfolgte wiederum mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese. Analog wurde die DNA des Vektors pBBP20 mit BstXI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3971 bp) isoliert.

25

30

Zur Ligierung wurden 0,93 µg (4,2 pmol) des PCR-Fragments und 11 µg (4,2 pmol) des Vektorfragments in Gegenwart von 102 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 500 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für zwei Tage bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl

35

des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20 °C für drei Tage wurde zentrifugiert (25 min, 16000 g, 4 °C). Das Präzipitat wurde
5 mit jeweils 200 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 43,6 µl TE/10 (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration der erhaltenen Lösung wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenzintensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Vergleich mit
10 einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Präparation elektrokompenter Zellen des *E. coli* K12-Stamms XL1-Blue (Bullock et al., BioTechniques 5 (1987), 376-379) erfolgte gemäß den von Tung und Chow (Trends Genet. 11 (1995), 128-129) und von Hengen (Trends Biochem. Sci. 21 (1996), 75-76) beschriebenen Methoden. 1 l LB-Medium wurde durch Zugabe einer stationären XL1-Blue Übernachtskultur auf
20 eine optische Dichte bei 600 nm, OD₆₀₀ = 0,08 eingestellt und bei 200 Upm und 26 °C in einem 3 l-Erlenmeyer-Kolben inkubiert. Nach Erreichen von OD₆₀₀ = 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit jeweils
25 500 ml eiskaltem 10 % w/v Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem GYT-Medium (10 % w/v Glycerin, 0,125 % w/v Hefeextrakt, 0,25 % w/v Trypton) resuspendiert.

Zur Elektroporation wurde das Easyjec T Basic System (EquiBio) mit den dazugehörigen Küvetten (Elektrodenabstand 2 mm) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Jeweils 5 bis 6 µl der oben beschriebenen DNA-Lösung (245 ng/µl) wurde mit 40 µl der Zellsuspension gemischt, 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Küvette
35 überführt. Nach der Elektroporation wurde die Suspension sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium (2 % w/v Trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend jeweils für 2 min bei



3600 g sedimentiert, in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) resuspendiert und zu je 200 µl auf Agar-Platten (140 mm Durchmesser) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Unter Einsatz von insgesamt 10,7 µg der ligierten DNA wurden auf diese Weise mit acht Elektroporationsansätzen $3,73 \cdot 10^8$ Transformanten erhalten, die auf 40 Agar-Platten verteilt waren.

Nach Inkubation für 14 h bei 32 °C wurden die so erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt. 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium wurden mit 2,88 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 1,0 lag. Diese Kultur wurde für 6 h bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer stationären Zelldichte inkubiert und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 100 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Herstellung einer Bibliothek von rekombinanten Phagemiden (Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press), welche die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusion mit dem verkürzten Hüllprotein pIII tragen, wurde die so gewonnene Phasmid-DNA zur Transformation elektrokompeter Zellen von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Elektroporation wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des Easyjec T Basic Systems durchgeführt. In insgesamt 13 Ansätzen wurden je 40 µl der Zellsuspension elektrokompeter Zellen mit jeweils 2 µg der DNA in einem Volumen von 5 µl transformiert. Nach der Elektroporation wurde die erhaltene Zellsuspension aus jedem Ansatz sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt.

Diese Ansätze wurden vereinigt (Volumen = 26 ml), mit 74 ml 2xYT-Medium und mit 100 µl Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l) versetzt. Durch Ausplattieren von

100 µl einer $1:10^5$ -Verdünnung der erhaltenen Suspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanten zu $1,1 \cdot 10^{10}$ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C und 160 Upm wurde die Kultur mit 500 µl VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 60 min bei 37 °C, 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26 °C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (50 µl einer 50 µg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 µg/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26 °C, 160 Upm inkubiert.

15 Zwecks Abtrennung der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (15 min, 12000 g, 4 °C). Der Überstand, der die Phagemidpartikel enthielt, wurde sterilfiltriert (0,45 µm), mit 1/4 Volumen (25 ml) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18000 g, 4 °C) wurden die präzipitierten Phagemidpartikel in insgesamt 4 ml kaltem PBS (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, pH 7,4) gelöst. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und zu gleichen Volumina auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Nach Abzentrifugieren ungelöster Bestandteile (5 min, 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur erneuten Fällung der Phagemidpartikel wurde mit 1/4 Volumen (jeweils 0,25 ml pro Reaktionsgefäß) 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 18500 g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt; und die präzipitierten Phagemidpartikel wurden in jeweils 0,5 ml PBS gelöst. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Lösung zur Klärung noch einmal zentrifugiert (5 min, 18500 g, 4 °C). Der Überstand mit den Phagemidpartikeln (zwischen $1 \cdot 10^{12}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) wurde anschließend für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung der die Muteine des Bilin-Bindungsproteins präsentierenden rekombinanten Phagemide wurden Immuno-Sticks (NUNC) verwendet. Diese wurden über Nacht mit 800 µl eines Konjugats (100 µg/ml) aus Ribonuclease A (RNaseA) und
5 Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugats wurden 1,46 µmol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS, Boehringer Mannheim) in 25 µl DMSO µl-
10 weise und unter stetiger Durchmischung zu 0,73 µmol (10 mg) RNaseA (Fluka) in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz von dem RNaseA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule
15 (Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBST (PBS mit 0,1 % v/v Tween 20) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach drei-
20 maligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBST wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 µl der Phagemidlösung und 500 µl Blockierungspuffer (2 % w/v BSA in PBST) für 1 h bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde die Lösung abgezogen und der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 µl PBST für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 µl einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg
30 Digoxigenin (Fluka) wurden hierzu in 19,2 µl DMF gelöst und zu 930,8 µl PBS gegeben) kompetitiv eluiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurden die 950 µl Lösung der erhaltenen Elutionsfraktion (je nach Selektionszyklus zwischen
35 10^6 und 10^8 Colony-forming Units) kurz auf 37 °C erwärmt, mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4 °C), in 800 µl fri-

schen 2xYT-Mediums resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32 °C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt.

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert, mit 250 µl VCS-M13 Helferphage ($1,1 \cdot 10^{12}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert, und es wurde weiter verfahren wie bereits oben beschrieben.

Mit den aus der ersten Affinitätsanreicherung erhaltenen Phagemiden wurden nacheinander acht weitere Anreicherungszyklen mit Immuno-Sticks, welche frisch mit dem Digoxigenin-RNaseA-Konjugat beschichtet waren, durchgeführt. Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Mischung der erhaltenen Kolonien wurde, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert. Mit dieser Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

Um die Muteine des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem Strep-tag II sowie der Albumin-Bindungsdomäne produzieren zu können, wurde die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Vektor pBBP20 in den Vektor pBBP22 subkloniert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP22 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:9 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.

Dazu wurde die aus der Mischung der *E. coli*-Kolonien isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie oben beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µl (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Mit 5 µl dieses Ligierungsansatzes wurden 200 µl kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert (Sambrook et al., supra), wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.

Die Transformanden wurden anschließend mittels eines Colony Screening Assays auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe durchgemustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 µm) aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 µm) nach den Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin (HSA, Sigma) in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt

worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

- 5 Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Muteine
10 als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

- 15 Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBST gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml einer Lösung von 10 µg/ml eines Konjugates von BSA mit Digoxigenin in PBST inkubiert.

- 20 Zur Herstellung des Konjugates von BSA (Sigma) und Digoxigenin wurde eine Lösung von 3,0 µmol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer
25 PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt.

- 30 Um gebundenes Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach zweimaligem Waschen in 20 ml PBST für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim, 1:1000 verdünnt in PBST) inkubiert. Die Membran wurde anschließend für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml
35 PBST und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM Mg₂Cl) geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, Roth, 50 µg/ml in Dimethylform-

amid) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma, 75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Muteine des Bilin-Bindungsproteins, in Form der Fusionsproteine mit dem Strep-tag und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Vier der Kolonien von der oberen Membran, welche zu einem ausgeprägten Farbsignal Anlaß gaben, wurden zur Herstellung von Kulturen in LB/Amp-Medium mit einem Volumen von 4 ml verwendet. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des JETquick Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert, und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe des T7 Sequencing Kits (Pharmacia) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SEQ ID NO:10 und SEQ ID NO:11. Dabei wurde gefunden, daß alle vier untersuchten Plasmide die gleiche Nukleotidsequenz trugen. Das entsprechende Genprodukt wurde als DigA bezeichnet (SEQ ID NO:12). Die Nukleotidsequenz von DigA wurde in die Aminosäuresequenz übersetzt und ist im Sequenzprotokoll wiedergegeben.

Beispiel 2: Partielle Zufallsmutagenese des Muteins DigA und Selektion von Muteinen mit verbesserter Bindungsaffinität zu Digoxigenin

Zur Verbesserung der Affinität zwischen dem Mutein DigA und Digoxigenin, welche gemäß Beispiel 3 zu 295 ± 36 nM bestimmt wurde, wurden die 6 Aminosäurepositionen 28, 31 und 34-37 in DigA für eine weitergehende partielle Zufallsmutagenese ausgewählt.

Zur Mutagenese dieser Positionen wurde die PCR mit einem degenerierten Oligodesoxynukleotid-Primer durchgeführt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 µl, wobei 2 ng der für DigA (SEQ ID NO:12) kodierenden Plasmid-DNA des Vektors pBBP22 als Matrize eingesetzt wurden. Der Reakti-

onsansatz enthielt 50 pmol der beiden Primer SEQ ID NO:13 und SEQ ID NO:7 sowie die restlichen Komponenten gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Methode. Die PCR fand bei 20 Temperaturzyklen von 1 min bei 94 °C, 1 min bei 65 °C, 1,5 min bei 72 °C statt, gefolgt von einer abschließenden Inkubation für 5 min bei 60 °C. Das erhaltene DNA-Fragment wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und anschließend mit *Bst*XI nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die Reinigung des resultierenden DNA-Fragmentes von 335 bp Länge erfolgte wiederum durch präparative Agarose-Gelelektrophorese.

Entsprechend wurde die DNA des Vektors pBBP24 mit *Bst*XI geschnitten und das erhaltene Fragment von 4028 bp isoliert. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP24 ist mit der kodierte Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:14 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit der *Hind*III-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75. pBBP24 ist weitestgehend identisch mit pBBP20 wobei das BBP-Gen mittels entsprechend eingeführter Stopp-Kodons inaktiviert ist.

Zur Ligierung wurden 1,3 µg des geschnittenen DNA-Fragmentes aus der PCR und 16,0 µg des Fragmentes von pBBP24 in Gegenwart von 120 Weiss Units T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 600 µl (50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml BSA) für 18 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA gefällt, indem jeweils 24 µl des Ligierungsansatzes mit 10 µg tRNA aus Hefe (Boehringer Mannheim), 25 µl 5 M Ammoniumacetat und 100 µl Ethanol versetzt wurden. Nach Inkubation bei -20 °C für zwei Wochen wurde zentrifugiert (20 min, 16000 g, 4 °C). Das Präzipitat wurde mit jeweils 150 µl Ethanol (70 % v/v, -20 °C) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 80 µl TE/10 aufgenommen.

Die Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit der ligierten DNA durch Elektroporation wurde gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt, wobei in 16 Ansät-

zen jeweils 40 µl Zellsuspension elektrokompeter Zellen mit 5 µl der DNA-Lösung gemischt wurden. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2 ml frischem, eiskaltem SOC-Medium verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 200 Upm geschüttelt.

5

Die vereinigten Suspensionen wurden mit 168 ml 2xYT-Medium und mit 200 µl Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 mg/l). Durch Ausplattieren von 100 µl einer 1:10⁴-Verdünnung der erhaltenen Zellsuspension auf Agar-Platten mit LB/Amp-Medium wurde die Gesamtzahl der erhaltenen Transformanten zu 1,48·10⁹ abgeschätzt. Nach Inkubation für 60 min bei 37 °C und 160 Upm wurden die Transformanten mit 4 ml VCS-M13 Helferphage (6,3·10¹¹ pfu/ml, Stratagene) infiziert und für weitere 30 min bei 37 °C und 160 Upm geschüttelt. Anschließend wurden 400 µl Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml, Endkonzentration 70 mg/l) zugegeben, die Inkubatortemperatur auf 26 °C erniedrigt und nach 10 min zur Induktion der Genexpression Anhydrotetracyclin (100 µl einer 50 µg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Endkonzentration 25 µg/l) zugesetzt. Zur Produktion der Phagemide wurde die Kultur schließlich für 7 h bei 26 °C und 160 Upm inkubiert. Die Abtrennung der Zellen und die Reinigung der Phagemide durch Fällung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben.

25 Zur Affinitätsanreicherung aus der Bibliothek der Phagemide, welche das partiell mutierte Mutein DigA präsentierten, wurden mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

30

Zur Herstellung eines Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin und Biotin wurden 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 µl DMSO und 1,5 µmol (0,68 mg) D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim) in 12,5 µl DMSO 35 µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Doppelkonjugat abgetrennt.

- Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 µl einer 0,5 µM Lösung des Doppelkonjugats (33,5 µg/ml) in PBS mit 260 µl einer Lösung der frisch präparierten Phagemide (zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß Komplexbildung zwischen der Digoxigenin-
gruppe und den von den Phagemiden präsentierten Muteinen eintreten konnte. Anschließend wurde 100 µl einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.
- Parallel wurden 100 µl der kommerziell erhältlichen Suspension der paramagnetischen Partikel dreimal mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml Eppendorfgefäßes für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Eppendorfgefäßes gesammelt und der Überstand abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 µl 2 % w/v BSA in PBST für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die paramagnetischen Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurde die Mischung schließlich mit 10 µl einer Lösung von 4 µM D-Desthiobiotin (Sigma) in PBS versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhindert, daß das Strep-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Muteinen und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex bilden konnte.
- Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBST unter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 µl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde im Anschluß daran sofort durch Zugabe von 140 µl 0,5 M Tris neutralisiert.

Zur Vermehrung der Phagemide wurde die erhaltene Elutionsfraktion entsprechend der Vorgehensweise in Beispiel 1 mit 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue (OD₅₅₀ = 0,5) gemischt und für 30 min bei 37 °C, 200 Upm inkubiert. Die mit den Phagemiden infizierten Zellen wurden anschließend sedimentiert (2 min, 4420 g, 4 °C), in 800 µl frischem 2xYT-Medium resuspendiert und auf vier Agar-Platten mit LB/Amp-Medium (140 mm Durchmesser) ausplattiert. Nach Inkubation für 14 h bei 32 °C wurden die erhaltenen Kolonien unter Zusatz von je 10 ml 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und zur vollständigen Resuspendierung für 20 min bei 37 °C, 200 Upm geschüttelt.

15

Zur wiederholten Produktion und Affinitätsanreicherung von Phagemidpartikeln wurde 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium mit 0,2 bis 1 ml dieser Suspension inokuliert, so daß die Zelldichte OD₅₅₀ bei 0,08 lag. Diese Kultur wurde bei 37 °C, 160 Upm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert und mit 300 µl VCS-M13 Helferphage ($6,3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml, Stratagene) infiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Affinitätsselektion mit den paramagnetischen Partikeln und dem Digoxygenin/Biotin-Doppelkonjugat unter den oben angegebenen Bedingungen. Auf diese Weise wurden insgesamt 4 Selektionszyklen durchgeführt.

25

Die nach dem letzten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide wurden wiederum zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Mit der Mischung der erhaltenen Kolonien, die, wie oben beschrieben, mit 2xYT/Amp-Medium von den Agar-Platten abgeschabt und resuspendiert worden waren, wurden 50 ml 2xYT/Amp-Medium angeimpft und die Phasmid-DNA unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

35

Anschließend wurde die Genkassette zwischen den beiden BstXI-Schnittstellen wie in Beispiel 1 aus dem Vektor pBBP24 in den Vektor pBBP22 subkloniert und kompetente Zellen des Stamms *E.*

coli TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert. Die Transformanten wurden schließlich wiederum gemäß Beispiel 1 auf die Produktion von Muteinen mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe mittels des Colony Screening Assays durchgemustert.

Sieben der Kolonien, die im Colony Screening Assay eine starke Signalintensität aufwiesen, wurden kultiviert. Ihre Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Spin Kits (Genomed) nach den Angaben des Herstellers isoliert und der für das Mutein kodierende Genabschnitt wurde wie in Beispiel 1 einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurde gefunden, daß alle untersuchten Plasmide unterschiedliche Sequenzen besaßen. Nach Übersetzung der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wiesen sechs der sieben untersuchten Varianten ein Amber Stopp-Kodon an der Aminosäureposition 28 auf. Dieses Stopp-Kodon wurde allerdings bei der Wahl geeigneter Amber-Suppressorstämme, wie zum Beispiel *E. coli* XL1-Blue oder TG1-F⁻, zumindest teilweise supprimiert und statt dessen als Glutamin translatiert. Somit wurde sowohl im Verlauf der Affinitätsanreicherung als auch beim Colony Screening Assay funktionelles Protein in voller Länge produziert.

Als einziges unter den gefundenen Muteinen wies das Mutein mit der SEQ ID NO:15 kein Amber-Stoppkodon auf, so daß es sich zur bakteriellen Produktion besonders gut eignete. Dieses Mutein, auch als DigA16 bezeichnet, wurde demzufolge hinsichtlich seiner Bindefähigkeit für die Digoxigenin-Gruppe genauer charakterisiert.

Beispiel 3: Produktion der Muteine DigA und DigA16 und Ermittlung ihrer Affinität für Digoxigenin und dessen Derivate durch Fluoreszenztitration

Zur präparativen Produktion der aus den vorangegangenen Beispielen erhaltenen Muteine des Bilin-Bindungsproteins wurde der kodierende Genabschnitt zwischen den beiden BstXI-Schnittstellen aus dem Vektor des Typs pBBP22 in das Expressions-

plasmid pBBP21 subkloniert. Das dabei erhaltene Plasmid kodierte für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, gefolgt von dem Mutein und dem Strep-tag II-Affinitätsanhängsel.

- 5 Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP21 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:16 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der *Xba*I-Schnittstelle und endet mit einem Hexanukleotid, das durch Ligierung eines stumpfen Strangendes mit einem auf-
- 10 gefüllten *Hind*III-Strangende erhalten wurde, wobei die ursprüngliche *Hind*III-Schnittstelle verloren ging. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pASK75.
- 15 Zur Subklonierung wurde die für das jeweilige Mutein kodierende Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt. In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP21
- 20 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (4132 bp) isoliert.

- Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µl (30 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) mit 1,5 Weiss Units T4 DNA Ligase (Promega) versetzt und für 16 h bei 16 °C inkubiert. Mit 5 µl des Ligierungsansatzes wurde dann *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron et al., Gene 33 (1985), 103-119) nach der CaCl₂-Methode transformiert, wobei 2,2 ml einer Zellsuspension erhalten wurden.
- 25
 - 30 Von dieser Suspension wurden 100 µl auf einer Agar-Platte mit LB/Amp-Medium ausplattiert und für 14 h bei 37 °C inkubiert.

- Zur Proteinproduktion wurde eine der erhaltenen Einzelkolonien ausgewählt, eine 50 ml-Vorkultur (LB/Amp-Medium) damit ange-
- 35 impft und bei 30 °C und 200 Upm über Nacht inkubiert. 40 ml der Vorkultur wurden auf 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben überimpft, woraufhin die Kultur bei 22 °C und 200 Upm inkubiert wurde. Bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 µg/l Anhydrotetra-

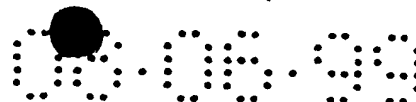
cyclin (200 µl einer 2 mg/ml-Stammlösung in DMF) induziert und für weitere 3 h bei 22 °C, 200 Upm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 4420 g, 4 °C) und
5 nach Entfernung des Überstands unter Kühlung auf Eis in 20 ml
Periplasma-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM
Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Inkubation für 30
min auf Eis wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfol-
genden Zentrifugationsschritten abgetrennt (15 min, 4420 g, 4
10 °C und 15 min, 30000 g, 4 °C). Der so gewonnene periplasmati-
sche Proteinextrakt wurde gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH
8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert, sterilfiltriert und
zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

15 Die Reinigung erfolgte mittels des an den C-Terminus der Mu-
teine fusionierten Strep-tag II-Affinitätsanhängsels (Schmidt
und Skerra, Protein Eng. 6 (1993), 109-122). Im vorliegenden
Fall wurde das Streptavidinmutein "1" eingesetzt (Voss und
Skerra, Protein Eng. 10 (1997), 975-982), welches (mit 5 mg/ml
20 immobilisiertem Streptavidin, bezogen auf das Bettvolumen der
Matrix) an eine aktivierte Sepharose gekoppelt war.

Eine mit 2 ml dieses Materials befüllte Chromatographiesäule
wurde bei 4 °C und einer Flußrate von 20 ml/h mit 10 ml SA-
25 Puffer äquilibriert. Die Chromatographie wurde durch Messung
der Absorption bei 280 nm des Eluats in einem Durchfluß-Photo-
meter verfolgt. Nach dem Auftragen des periplasmatischen Pro-
teinextrakts wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-
Puffer gewaschen. Gebundenes Mutein wurde anschließend mit 10
30 ml einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) in SA-Puf-
fer eluiert. Die Fraktionen, die das gereinigte Mutein ent-
hielten, wurden mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektropho-
rese (Fling und Gregerson, Anal. Biochem. 155 (1986), 83-88)
überprüft und vereinigt. Die Proteinausbeuten lagen zwischen
35 200 µg und 800 µg je 2 l Kultur.

Die Liganden-Bindungseigenschaften der Muteine DigA, DigA16
sowie des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins (SEQ ID NO:16)
wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt.



41

Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tyrosin- und/oder Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Als Liganden wurden Digoxigenin (Fluka), Digoxin (Fluka), Digitoxigenin (Fluka), Digitoxin (Fluka), Testosteron (Sigma), Ouabain (Fluka) sowie 4-Aminofluorescein (Fluka) eingesetzt. Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine signifikante Eigenfluoreszenz oder Absorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA. Die Lösung des jeweiligen gereinigten Muteins wurde viermal gegen diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen auf eine Konzentration von 1 μM eingestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert (Filtropur S 0,45 μm , Sarstedt). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm unter Verwendung kalkulatorischer Extinktionskoeffizienten von 53580 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für DigA und DigA16 (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group). Für Bbp wurde der nach Gill und von Hippel (Anal. Biochem. 182 (1989), 319-326) in Gegenwart von Guanidiniumchlorid korrigierte kalkulatorische Extinktionskoeffizient von 54150 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ verwendet.

Zur Messung wurden 2 ml der Muteinlösung in einer Quarzküvette, die mit einem Rührfisch ausgestattet war, vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25 °C temperiert. Anschließend wurden insgesamt 40 μl einer 100 μM bis 500 μM Lösung des Liganden in demselben Puffer in Schritten von 1 μl bis 4 μl zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal als Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Abzug des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

Die so erhaltenen Meßwerte einer Titrationsreihe wurden gemäß folgender Formel durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogramms Kaleidagraph (Abelbeck Software) angepaßt.

$$5 \quad F = ([P]_t - [L]_t - K_d) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_d) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_d)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

Dabei bedeuten F die normierte Fluoreszenzintensität und $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt. $[P]_t$ als die Konzentration des Muteins, f_{PL} als
 10 Fluoreszenzkoeffizient des Mutein-Ligandkomplexes und K_d als die thermodynamische Dissoziationskonstante dieses Komplexes wurden als freie Parameter an die normierten Daten angepaßt.

Das Ergebnis der Fluoreszenztitrations des Muteins DigA16 mit
 15 den Liganden Digoxigenin, Digitoxigenin und Ouabain ist in Figur 1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich, daß Digitoxigenin noch stärker gebunden wird als Digoxigenin, während für Ouabain keine Bindung beobachtet wird.

20 Die aus den Fluoreszenztitrations resultierenden Werte für die Dissoziationskonstanten der Komplexe aus den Muteinen des Bilin-Bindungsproteins und den verschiedenen Liganden sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

<u>Bbp-Variante</u>	<u>Ligand</u>	<u>K_d [nM]</u>
Bbp:	Digoxigenin	-*
DigA:	Digoxigenin	295 ± 37
	Digoxin	200 ± 34
DigA16:	Digoxigenin	$30,2 \pm 3,6$
30	Digoxin	$31,1 \pm 3,2$
	Digitoxigenin	$2,8 \pm 2,7$
	Digitoxin	$2,7 \pm 2,0$
	Ouabain	-*
	Testosteron	-*
35	4-Aminofluorescein	-*

*keine nachweisbare Bindungsaktivität

Beispiel 4: Herstellung von Fusionsproteinen aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase und Verwendung zum Nachweis von Digoxigeningruppen in einem ELISA sowie im Western Blot

5

Um zwei verschiedene Fusionsproteine aus dem Mutein DigA16 und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit unterschiedlicher Anordnung der Partner innerhalb der Polypeptidkette zu produzieren, wurden unter Einsatz der dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Methoden die beiden Expressionsplasmide pBBP27 und pBBP29 konstruiert.

pBBP27 kodiert für ein Fusionsprotein aus PhoA einschließlich deren Signalsequenz, einem kurzen Peptid-Verbindungsstück mit der Aminosäuresequenz Pro-Pro-Ser-Ala, der dem maturen Mutein DigA16 entsprechenden Sequenz sowie dem Strep-tag II. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP27 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:17 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus DigA16 mit vorangestellter OmpA-Signalsequenz, gefolgt von der Peptidsequenz für das Strep-tag II, einer Sequenz von 5 Glycinresten und der maturen Sequenz der PhoA ohne die N-terminale Aminosäure Arginin. Ein relevanter Ausschnitt aus der Nukleinsäuresequenz von pBBP29 ist mit der kodierten Aminosäuresequenz im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO:18 wiedergegeben. Der Ausschnitt beginnt mit der XbaI-Schnittstelle und endet mit der HindIII-Schnittstelle. Die Vektorelemente außerhalb dieses Bereichs sind identisch mit dem Vektor pBBP21.

Beide Plasmide kodieren zusätzlich für die bakterielle Protein-Disulfidisomerase DsbC auf einem separaten, in 3'-Richtung gelegenen Cistron. Die Plasmide sind in Figur 2 schematisch dargestellt.

Die von den Plasmiden pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine wurden analog der in Beispiel 3 beschriebenen Methode zur Herstellung der einfachen Muteine produziert. Um nicht die Metallionen aus dem aktiven Zentrum der PhoA zu komplexieren, wurde der Aufschluß des bakteriellen Periplasmas mit EDTA-freiem Aufschlußpuffer durchgeführt. Als ein die äußere Zellmembran destabilisierendes Agens wurde dem Puffer Polymyxin-B-sulfat (2 mg/ml, Sigma) zugegeben. Alle weiteren zur Reinigung eingesetzten Puffer waren ebenfalls EDTA-frei.

10

Die mittels des Strep-tag II durch Affinitätschromatographie gereinigten Fusionsproteine wurden über Nacht gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Ausbeuten der Fusionsproteine lagen zwischen 100 und 200 µg je 2 l Kulturmedium. Die Reinheit der erhaltenen Fusionsproteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, entsprechend Beispiel 3, überprüft und zu 90-95 % bestimmt. Anschließend wurden die Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Konjugaten der Digoxigenin-Gruppe mit verschiedenen Proteinen sowohl in einem Sandwich-ELISA als auch im Western-Blot verwendet.

20

Während die verwendeten Konjugate von Digoxigenin mit RNaseA und BSA entsprechend Beispiel 1 hergestellt wurden, wurde ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin (Sigma) hergestellt, indem 1,5 µmol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % Natriumhydrogencarbonat gegeben wurden. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt.

25

30

Zum Nachweis von Digoxigenin-Gruppen in einem Sandwich-ELISA wurden die Vertiefungen von jeweils zwei Spalten einer Mikrotiterplatte (ELISA-Strips, 2x8 Well mit hoher Bindekapazität, F-Form, Greiner) mit je 100 µl einer 100 µg/ml-Lösung des BSA-Digoxigenin-Konjugates bzw. des Ovalbumin-Digoxigenin-Konjugates in PBS gefüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurden die Vertiefungen einer fünften Spalte der Mikro-

35

- titerplatte mit 100 μ l einer 100 μ g/ml Lösung von nicht konjugiertem BSA (Sigma) in PBS befüllt und ebenfalls über Nacht bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 μ l einer Lösung von 2 % w/v BSA in PBST für 2 h abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 50 μ l einer 1 μ M Lösung des gereinigten Fusionsproteins gefüllt und die Tween-Konzentration durch Zugabe von 1 μ l einer Lösung von 5 % v/v Tween auf 0,1 % v/v eingestellt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l PBST vorgelegt. Anschließend wurde jeweils in die zweite Vertiefung 50 μ l des gereinigten Fusionsproteins pipettiert, gemischt und davon ausgehend in den weiteren Vertiefungen der Spalte schrittweise 1:2 Verdünnungen zubereitet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit PBST und zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der an die Digoxigeningruppen gebundenen Fusionsproteine erfolgte schließlich mittels der durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Amresco) in AP-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris/HCl pH 8,8) in die Vertiefungen gefüllt und die Produktbildung durch Messung der Absorption bei 405 nm in einem SpectraMax 250-Photometer (Molecular Devices) verfolgt.
- Das Ergebnis dieser Messung ist in Figur 3 wiedergegeben. Dementsprechend wird die Digoxigeningruppe sowohl als Konjugat mit BSA wie auch als Konjugat mit Ovalbumin erkannt, was darauf schließen läßt, daß die Bindung durch das Mutein DigA16 kontextunabhängig erfolgt. Weiterhin sind beide Fusionsproteine sowohl hinsichtlich der Bindungsfunktion für die Digoxigeningruppe als auch enzymatisch aktiv, und sie geben trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus Anlaß zu nahezu identischen Signalen.
- Zur Verwendung der von den Vektoren pBBP27 und pBBP29 kodierten Fusionsproteine im Western-Blot wurden 5 μ l einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an Digoxigenin-BSA-Konjugat, Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat und Digoxigenin-RNaseA-Konjugat gleichzeitig jeweils 100 μ g/ml betrug, sowie 5 μ l

einer Proteinmischung in PBS, deren Konzentration an nicht-derivatisiertem BSA, Ovalbumin und RNaseA ebenfalls gleichzeitig jeweils 100 µg/ml betrug, zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde das Proteingemisch durch Elektrotransfer auf Nitrozellulose übertragen (Blake et al., Anal. Biochem. 136 (1984), 175-179). Die Membran wurde anschließend dreimal für 5 min in 10 ml PBST gewaschen und für 1 h mit 10 ml einer 0,5 µM Lösung jeweils eines der beiden Fusionsproteine inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 5 min in 10 ml PBST und zweimal für 5 min in 10 ml PBS gewaschen und schließlich für 10 min in 10 ml AP-Puffer geschwenkt. Zur chromogenen Nachweisreaktion wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl BCIP (50 µg/ml in Dimethylformamid) und 5 µl NBT (75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert und auf diese Weise gebundenes Fusionsprotein nachgewiesen.

Das Ergebnis dieses Nachweisverfahrens ist in Figur 4 wiedergegeben. Es zeigt sich wiederum, daß die Bindung der Digoxigenin-Gruppe durch beide Fusionsproteine unabhängig vom Trägerprotein ist, und daß mit beiden Fusionsproteinen vergleichbare Signalintensitäten erzielt werden. Dieselben Trägerproteine führen zu keinerlei Signal, wenn sie nicht mit der Digoxigenin-Gruppe konjugiert sind.

00.05.99

67

Patentansprüche

1. Polypeptid, ausgewählt aus Muteinen des Bilin-Bindungsproteins,
5 dadurch gekennzeichnet, daß es
(a) Digoxigenin oder Konjugate des Digoxigenins zu binden vermag,
(b) Ouabain, Testosteron und 4-Aminofluorescein nicht bindet und
10 (c) an mindestens einer der Sequenzpositionen 28, 31, 34, 35, 36, 37, 58, 60, 69, 88, 90, 95, 97, 114, 116, 125 und 127 des Bilin-Bindungsproteins eine Aminosäuresubstitution aufweist.
- 15 2. Polypeptid nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Dissoziationskonstante des Komplexes mit Digoxigenin 100 nM oder kleiner ist.
- 20 3. Polypeptid nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus Glu(28)->Gln, Lys(31)->Ala, Asn(34)->Asp,
Ser(35)->His, Val(36)->Ile, Glu(37)->Thr, Asn(58)->Arg,
25 His(60)->Ser, Ile(69)->Ser, Leu(88)->Tyr, Tyr(90)->Ile, Lys(95)->Gln, Asn(97)->Gly, Tyr(114)->Phe, Lys(116)->Ser, Gln(125)->Met und Phe(127)->Leu im Vergleich zum Bilin-Bindungsprotein trägt.
- 30 4. Polypeptid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mindestens eine Markierungsgruppe, ausgewählt aus Enzymmarkierung, radioaktiver Markierung, Fluoreszenzmarkierung, Chromophormarkierung, (Bio)-Lumineszenzmarkierung
35 oder Markierung mit Haptenen, Biotin, Metallkomplexen, Metallen oder kolloidalem Gold, trägt.
5. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4,

- dadurch gekennzeichnet,
daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Signalsequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Aminoterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.
- 5
6. Fusionsproteine von Polypeptiden nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
10 daß ein Enzym, ein anderes Protein oder eine Proteindomäne, eine Targeting-Sequenz und/oder ein Affinitätspeptid an den Carboxyterminus des Polypeptids in operabler Weise fusioniert ist.
- 15 7. Nukleinsäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine für ein Mutein oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodierende Sequenz umfaßt.
- 20
8. Verfahren zur Herstellung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß die für das Mutein oder das Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins kodierende Nukleinsäure in einer bakteriellen oder eukaryontischen Wirtszelle zur Expression gebracht wird und das Polypeptid aus der Zelle oder dem Kulturüberstand gewonnen wird.
- 30
9. Verwendung eines Muteins oder eines Fusionsproteins eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 zur Bindung, zum Nachweis, zur Bestimmung, Immobilisierung oder zur Abtrennung von Digo-
35 xigenin oder von Konjugaten des Digoxigenins mit Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, anderen biologischen oder synthetischen Makromolekülen oder niedermolekularen chemischen Verbindungen.

68.06.99

69

- 45 -

10. Verfahren zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe, wobei ein Mutein des Bilin-Bindungsproteins oder ein Fusionsprotein eines Muteins des Bilin-Bindungsproteins nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 mit Digoxigenin oder mit Konjugaten des Digoxigenins unter geeigneten Bedingungen, um eine Bindung des Muteins an die Digoxigenin-Gruppe zu bewirken, in Kontakt gebracht und das Mutein oder das Fusionsprotein des Muteins bestimmt wird.

08.08.99

570
/ 73

- 47 -

Sequenzprotokoll

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Prof. Dr. Arne Skerra
STRASSE: Max-Lehner-Straße 18
ORT: Freising
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 85354
TELEFON: 08161-714351
TELEFAX: 08161-714352

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Muteine des Bilin-Bindungsproteins

ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM PC-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
SOFTWARE: Microsoft Word, Format Text

DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: noch nicht bekannt
ANMELDETAG: noch nicht bekannt

ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1219 Basenpaare
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Doppelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Phasmids pBBP20

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
LAGE: (85..1209)
SONSTIGE ANGABEN:
/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
Strep-tag II und Fragment des Phagen-
Hüllproteins pIII"
/Codon=(Sequenz:"TAG", Aminosäure:Gln)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
LAGE: (85..606)
SONSTIGE ANGABEN:
/Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (637..639)

SONSTIGE ANGABEN:

/Sonstiges="Amber-Stopcodon"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (640..1209)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

TCTAGTTAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT		45			
			Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile					
			-21	-20					-15						
GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90
Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	
			-10					-5				-1	1		
TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135
Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe	
		5					10					15			
GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	AAA	TAC	180
Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr	
		20					25					30			
CCC	AAC	TCA	GTT	GAG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225
Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr	
		35					40					45			
ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	AAC	TAC	CAC	GTA	ATC	270
Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	His	Val	Ile	
		50					55					60			
CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	ATT	GAA	GGA	ACT	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
		65					70					75			
GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	CTG	ACT	TAC	GGA	GGT	360
Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly	
		80					85					90			
GTC	ACC	AAG	GAG	AAC	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
		95					100					105			

AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TAC	TGC	AAA	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
		110					115					120			
GGA	CAC	CAA	GAC	TTC	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
Gly	His	Gln	Asp	Phe	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
		125					130					135			
ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
		140					145					150			
CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
		155					160					165			
GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
		170					175					180			
GAA	AAA	TAG	GCT	GGC	GGC	GGC	TCT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	675
Glu	Lys	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
		185					190					195			
TCT	GAG	GGT	GGT	GGC	TCT	GAG	GGT	GGC	GGT	TCT	GAG	GGT	GGC	GGC	720
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	
		200					205					210			
TCT	GAG	GGA	GGC	GGT	TCC	GGT	GGT	GGC	TCT	GGT	TCC	GGT	GAT	TTT	765
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Phe	
		215					220					225			
GAT	TAT	GAA	AAG	ATG	GCA	AAC	GCT	AAT	AAG	GGG	GCT	ATG	ACC	GAA	810
Asp	Tyr	Glu	Lys	Met	Ala	Asn	Ala	Asn	Lys	Gly	Ala	Met	Thr	Glu	
		230					235					240			
AAT	GCC	GAT	GAA	AAC	GCG	CTA	CAG	TCT	GAC	GCT	AAA	GGC	AAA	CTT	855
Asn	Ala	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Ala	Lys	Gly	Lys	Leu	
		245					250					255			
GAT	TCT	GTC	GCT	ACT	GAT	TAC	GGT	GCT	GCT	ATC	GAT	GGT	TTC	ATT	900
Asp	Ser	Val	Ala	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly	Phe	Ile	
		260					265					270			
GGT	GAC	GTT	TCC	GGC	CTT	GCT	AAT	GGT	AAT	GGT	GCT	ACT	GGT	GAT	945
Gly	Asp	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Gly	Asp	
		275					280					285			
TTT	GCT	GGC	TCT	AAT	TCC	CAA	ATG	GCT	CAA	GTC	GGT	GAC	GGT	GAT	990
Phe	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	Gly	Asp	
		290					295					300			
AAT	TCA	CCT	TTA	ATG	AAT	AAT	TTC	CGT	CAA	TAT	TTA	CCT	TCC	CTC	1035
Asn	Ser	Pro	Leu	Met	Asn	Asn	Phe	Arg	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	
		305					310					315			

CCT	CAA	TCG	GTT	GAA	TGT	CGC	CCT	TTT	GTC	TTT	GGC	GCT	GGT	AAA	1080
Pro	Gln	Ser	Val	Glu	Cys	Arg	Pro	Phe	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Lys	
		320					325					330			

CCA	TAT	GAA	TTT	TCT	ATT	GAT	TGT	GAC	AAA	ATA	AAC	TTA	TTC	CGT	1125
Pro	Tyr	Glu	Phe	Ser	Ile	Asp	Cys	Asp	Lys	Ile	Asn	Leu	Phe	Arg	
		335					340					345			

GGT GTC TTT GCG TTT CTT TTA TAT GTT GCC ACC TTT ATG TAT GTA 1170
Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val
350 355 360

TTT	TCT	ACG	TTT	GCT	AAC	ATA	CTG	CGT	AAT	AAG	GAG	TCT	1209
Phe	Ser	Thr	Phe	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Ser	
		365					370					375	

TAATAAGCTT 1219

ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 64 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

CCATGGTAAA	TGGTGGGAAG	TCGCCAAATA	CCCCNNKNMS	NNSNNKAAGT	50
ACGGAAAGTG	CGGA				64

ANGABEN ZU SEO ID NO:3:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 71 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

GGGTAGGCGG TACCTTCSNN AAAGTATTCC TTGCCGTGGA TTACMNGTA 50
SNNCGAACT TTGACACTCT T 71

ANGABEN ZU SEO ID NO:4:

SEOUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 74 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

CCAAGATTGG AAAGATCTAC CACAGCNSA CTNNKGGAGG TNNSACCVVS 50
GAGNNKGTAT TCAACGTACT CTCC 74

ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 78 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

TCTGGAGAGC ACCCAGACMN NGTCSNNGTG TCCCTTCTTG TCCTCGTCGT 50
NNGCAMN GTATCCGATG ATGTAGTT 78

ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 36 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

CTTCGACTGG TCCAGTACC ATGGTAAATG GTGGGA 36

ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 37 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

CACAGTAAG GACCATGCTT CTGGAGAGCA CCCAGAC 37

ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 46 Basen
ART: Nucleinsäure
STRANGFORM: Einzelstrang
TOPOLOGIE: linear
ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

AGATCTTTCC AATCTTGGAG TCACCAACTG GGTAGGCGGT ACCTTC 46

ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 793 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP22

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (85..783)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
Strep-tag II und Albumin-Bindungsdomäne"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (637..783)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Albumin-Bindungsdomäne aus Protein G"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT	45
			Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	
			-21	-20					-15		

GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90
Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	
			-10				-5				-1		1		

TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135
Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe	
			5				10					15			

GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	AAA	TAC	180
Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr	
		20					25					30			
CCC	AAC	TCA	GTT	GAG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225
Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr	
		35					40					45			
ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	AAC	TAC	CAC	GTA	ATC	270
Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	His	Val	Ile	
		50					55					60			
CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	ATT	GAA	GGA	ACT	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
		65					70					75			
GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	CTG	ACT	TAC	GGA	GGT	360
Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly	
		80					85					90			
GTC	ACC	AAG	GAG	AAC	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
		95					100					105			
AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TAC	TGC	AAA	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
		110					115					120			
GGA	CAC	CAA	GAC	TTC	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
Gly	His	Gln	Asp	Phe	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
		125					130					135			
ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
		140					145					150			
CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
		155					160					165			
GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
		170					175					180			
GAA	AAA	CCA	GCT	AGC	CTG	GCT	GAA	GCT	AAA	GTT	CTG	GCT	AAC	CGT	675
Glu	Lys	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	
		185					190					195			
GAA	CTG	GAC	AAA	TAC	GGT	GTT	TCC	GAC	TAC	TAC	AAA	AAC	CTC	ATC	720
Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	
		200					205					210			
AAC	AAC	GCT	AAA	ACC	GTT	GAA	GGT	GTT	AAA	GCT	CTG	ATC	GAC	GAA	765
Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	
		215					220					225			

ATT CTC GCA GCA CTG CCG TAATAAGCTT
 Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 230

793

ANGABEN ZU SEQ ID 10:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA

LÄNGE: 17 Basen
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

GACGGTGCCT GTCCCGA 17

ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 17 Basen
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

GACTACTGGG GAGCCGA 17

ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

SEQUENZCHARACTERISTIKA:

LÄNGE: 522
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Doppelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: codierende Sequenz des Muteins Diga

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
 LAGE: (1..522)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Mutein Diga ohne Fusionsanteile"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

GAC	GTG	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	45
Asp	Val	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	
1				5					10					15	
AAC	TTC	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	90
Asn	Phe	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	
				20					25					30	

AAA	TAC	CCC	CAT	CAC	GAG	CGG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	135
Lys	Tyr	Pro	His	His	Glu	Arg	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	
				35					40					45	
GAG	TAC	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	TAC	TCT	180
Glu	Tyr	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	
				50					55					60	
GTA	ATC	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	TAC	CCA	225
Val	Ile	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	
				65					70					75	
GTT	GGT	GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	TAC	ACT	ATT	270
Val	Gly	Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Tyr	Thr	Ile	
				80					85					90	
GGA	GGT	GTG	ACC	CAG	GAG	GGT	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	315
Gly	Gly	Val	Thr	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	
				95					100					105	
AAC	AAG	AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TTT	TGC	TCG	TAC	GAC	GAG	GAC	360
Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	Asp	
				110					115					120	
AAG	AAG	GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	405
Lys	Lys	Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	
				125					130					135	
GTC	CTT	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	450
Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	
				140					145					150	
GGC	TCC	CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	495
Gly	Ser	Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	
				155					160					165	
TCT	GAA	GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT							522
er	Glu	Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn							
				170											

ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 76 Basen

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: synthetisches Oligodesoxynukleotid

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

CTGGTCCCAG	TACCATGGTA	AATGGTGGNN	KGTCGCCNNK	TACCCCNKN	50
NKNNKNNKAA	GTACGAAAG	TGCGGA			76

ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1219 Basenpaare
 ART: Nucleinsäure
 STRANGFORM: Doppelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Phasmids pBBP24

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid
 LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
 LAGE: (85..1209)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein,
 Strep-tag II und Fragment des Phagen-
 Hüllproteins pIII, mit unterbrochenem
 Leserahmen"
 /Codon=(Sequenz:"TAG", Aminosäure:Gln)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
 LAGE: (85..606)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="matures Bilin-Bindungsprotein mit
 unterbrochenem Leserahmen"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
 LAGE: (607..636)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhangsel"

MERKMAL:

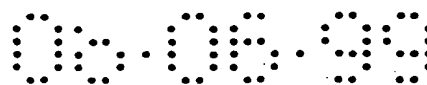
NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
 LAGE: (637..639)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Sonstiges="Amber-Stopcodon"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz
 LAGE: (640..1209)
 SONSTIGE ANGABEN:
 /Produkt="Aminosäuren 217-406 des Hüllproteins pIII"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT	45				
			Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile					
			-21	-20					-15						
GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90
Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	
			-10				-5				-1	1			



TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135
Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe	
		5					10					15			
GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	AAA	TAC	180
Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr	
		20					25					30			
CCC	AAC	TCA	GTT	GAG	AAG	TAC	GGA	AAT	TAA	TGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225
Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Asn			Trp	Ala	Glu	Tyr	
		35					40					45			
ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	AAC	TAC	CAC	GTA	ATC	270
Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	His	Val	Ile	
		50					55					60			
CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	ATT	GAA	GGA	ACT	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
		65					70					75			
GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	CTG	ACT	TAC	GGA	GGT	360
Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly	
		80					85					90			
GTC	ACC	AAG	GAG	AAC	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
		95					100					105			
AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TAC	TGC	AAA	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
		110					115					120			
GGA	CAC	CAA	GAC	TTC	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
Gly	His	Gln	Asp	Phe	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
		125					130					135			
ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
Tr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
		140					145					150			
CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
		155					160					165			
GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
		170					175					180			
GAA	AAA	TAG	GCT	GGC	GGC	GGC	TCT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC	GGC	GGC	675
Glu	Lys	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
		185					190					195			
TCT	GAG	GGT	GGT	GGC	TCT	GAG	GGT	GGC	GGT	TCT	GAG	GGT	GGC	GGC	720
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	
		200					205					210			

TCT	GAG	GGA	GGC	GGT	TCC	GGT	GGT	GGC	TCT	GGT	TCC	GGT	GAT	TTT	765
Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Phe	
		215					220					225			
GAT	TAT	GAA	AAG	ATG	GCA	AAC	GCT	AAT	AAG	GGG	GCT	ATG	ACC	GAA	810
Asp	Tyr	Glu	Lys	Met	Ala	Asn	Ala	Asn	Lys	Gly	Ala	Met	Thr	Glu	
		230					235					240			
AAT	GCC	GAT	GAA	AAC	GCG	CTA	CAG	TCT	GAC	GCT	AAA	GGC	AAA	CTT	855
Asn	Ala	Asp	Glu	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Ala	Lys	Gly	Lys	Leu	
		245					250					255			
GAT	TCT	GTC	GCT	ACT	GAT	TAC	GGT	GCT	GCT	ATC	GAT	GGT	TTC	ATT	900
Asp	Ser	Val	Ala	Thr	Asp	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Gly	Phe	Ile	
		260					265					270			
GGT	GAC	GTT	TCC	GGC	CTT	GCT	AAT	GGT	AAT	GGT	GCT	ACT	GGT	GAT	945
Gly	Asp	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Thr	Gly	Asp	
		275					280					285			
TTT	GCT	GGC	TCT	AAT	TCC	CAA	ATG	GCT	CAA	GTC	GGT	GAC	GGT	GAT	990
Phe	Ala	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Met	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	Gly	Asp	
		290					295					300			
AAT	TCA	CCT	TTA	ATG	AAT	AAT	TTC	CGT	CAA	TAT	TTA	CCT	TCC	CTC	1035
Asn	Ser	Pro	Leu	Met	Asn	Asn	Phe	Arg	Gln	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	
		305					310					315			
CCT	CAA	TCG	GTT	GAA	TGT	CGC	CCT	TTT	GTC	TTT	GGC	GCT	GGT	AAA	1080
Pro	Gln	Ser	Val	Glu	Cys	Arg	Pro	Phe	Val	Phe	Gly	Ala	Gly	Lys	
		320					325					330			
CCA	TAT	GAA	TTT	TCT	ATT	GAT	TGT	GAC	AAA	ATA	AAC	TTA	TTC	CGT	1125
Pro	Tyr	Glu	Phe	Ser	Ile	Asp	Cys	Asp	Lys	Ile	Asn	Leu	Phe	Arg	
		335					340					345			
GGT	GTC	TTT	GCG	TTT	CTT	TTA	TAT	GTT	GCC	ACC	TTT	ATG	TAT	GTA	1170
Gly	Val	Phe	Ala	Phe	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr	Phe	Met	Tyr	Val	
		350					355					360			
TTT	TCT	ACG	TTT	GCT	AAC	ATA	CTG	CGT	AAT	AAG	GAG	TCT			1209
Phe	Ser	Thr	Phe	Ala	Asn	Ile	Leu	Arg	Asn	Lys	Glu	Ser			
		365					370					375			
TAATAAGCTT															1219

ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

SEQUENZCHARACTERISTIKA:

LÄNGE: 522

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: codierende Sequenz des Muteins DigA16

MERKMAL :

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1..522)

SONSTIGE ANGABEN:

```
/Produkt="Mutein DigA16 ohne Fusionsanteile"
```

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

GAC GTG TAC CAC GAC GGT GCC TGT CCC GAA GTC AAG CCA GTC GAC 45
Asp Val Tyr His Asp Gly Ala Cys Pro Glu Val Lys Pro Val Asp
1 5 10 15

90	AAA	TGG	TGG	CAG	GTC	GCC	
	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Ala	
25							30

GCG TAC CCC GAT CAT ATT ACG AAG TAC GGA AAG TGC GGA TGG GCT 135
Ala Tyr Pro Asp His Ile Thr Lys Tyr Gly Lys Cys Gly Trp Ala
35 40 45

GAG TAC ACT CCT GAA GGC AAG AGT GTC AAA GTT TCG CGC TAC TCT 180
Glu Tyr Thr Pro Glu Gly Lys Ser Val Lys Val Ser Arg Tyr Ser
50 55 60

GTA ATC CAC GGC AAG GAA TAC TTT TCC GAA GGT ACC GCC TAC CCA 225
Val Ile His Gly Lys Glu Tyr Phe Ser Glu Gly Thr Ala Tyr Pro
65 70 75

GTT GGT GAC TCC AAG ATT GGA AAG ATC TAC CAC AGC TAC ACT ATT 270
Val Gly Asp Ser Lys Ile Gly Lys Ile Tyr His Ser Tyr Thr Ile
80 85 90

GGA GGT GTG ACC CAG GAG GGT GTA TTC AAC GTA CTC TCC ACT GAC 315
Gly Gly Val Thr Gln Glu Gly Val Phe Asn Val Leu Ser Thr Asp
95 100 105

AAC AAG AAC TAC ATC ATC GGA TAC TTT TGC TCG TAC GAC GAG GAC 360
Asn Lys Asn Tyr Ile Ile Gly Tyr Phe Cys Ser Tyr Asp Glu Asp
110 115 120

AAG	AAG	GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	405
Lys	Lys	Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	
				125					130					135	

GTC	CTT	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	450
Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	
			140						145					150	

GGC TCC CCA GTA GTC GAC TCC CAG AAA CTG GTA TAC AGT GAC TTC 495
Gly Ser Pro Val Val Asp Ser Gln Lys Leu Val Tyr Ser Asp Phe
155 160 165

TCT GAA GCC GCC TGC AAG GTC AAC AAT 522
Ser Glu Ala Ala Cys Lys Val Asn Asn
170

ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 1380 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP21

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (22...84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (85..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Bilin-Bindungsprotein und
Strep-tag II"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (658..717)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (718..1365)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="DsbC-Protein"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT		45			
			Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile					
			-21	-20					-15						
GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG	90
Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	
			-10					-5				-1	1		
TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC	135
Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe	
		5					10					15			
GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	GAA	GTC	GCC	AAA	TAC	180
Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Glu	Val	Ala	Lys	Tyr	
		20					25					30			
CCC	AAC	TCA	GTT	GAG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC	225
Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr	
		35					40					45			
ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	AAC	TAC	CAC	GTA	ATC	270
Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	His	Val	Ile	
		50					55					60			

08.08.99

- 61 -

CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	ATT	GAA	GGA	ACT	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
		65					70					75			
GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	CTG	ACT	TAC	GGA	GGT	360
Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Leu	Thr	Tyr	Gly	Gly	
		80					85					90			
GTC	ACC	AAG	GAG	AAC	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
Val	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
		95					100					105			
AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TAC	TGC	AAA	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
		110					115					120			
GGA	CAC	CAA	GAC	TTC	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
Gly	His	Gln	Asp	Phe	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
		125					130					135			
ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
		140					145					150			
CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
		155					160					165			
GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
		170					175					180			
GAA	AAA	TAATAAGCTT	CGGGAAGATT	T	ATG	AAG	AAA	GGT	TTT	ATG	675				
Glu	Lys				Met	Lys	Lys	Gly	Phe	Met					
					-20					-15					
TTG	TTT	ACT	TTG	TTA	GCG	GCG	TTT	TCA	GGC	TTT	GCT	CAG	GCT	GAT	720
Leu	Phe	Thr	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ala	Gln	Ala	Asp	
				-10					-5			-1	1		
GAC	GCG	GCA	ATT	CAA	CAA	ACG	TTA	GCC	AAA	ATG	GGC	ATC	AAA	AGC	765
Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	Gln	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Gly	Ile	Lys	Ser	
			5					10				15			
AGC	GAT	ATT	CAG	CCC	GCG	CCT	GTA	GCT	GGC	ATG	AAG	ACA	GTT	CTG	810
Ser	Asp	Ile	Gln	Pro	Ala	Pro	Val	Ala	Gly	Met	Lys	Thr	Val	Leu	
			20					25				30			
ACT	AAC	AGC	GGC	GTG	TTG	TAC	ATC	ACC	GAT	GAT	GGT	AAA	CAT	ATC	855
Thr	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Tyr	Ile	Thr	Asp	Asp	Gly	Lys	His	Ile	
			35					40				45			
ATT	CAG	GGG	CCA	ATG	TAT	GAC	GTT	AGT	GGC	ACG	GCT	CCG	GTC	AAT	900
Ile	Gln	Gly	Pro	Met	Tyr	Asp	Val	Ser	Gly	Thr	Ala	Pro	Val	Asn	
			50					55				60			

GTC	ACC	AAT	AAG	ATG	CTG	TTA	AAG	CAG	TTG	AAT	GCG	CTT	GAA	AAA	945
Val	Thr	Asn	Lys	Met	Leu	Leu	Lys	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	
			65					70					75		
GAG	ATG	ATC	GTT	TAT	AAA	GCG	CCG	CAG	GAA	AAA	CAC	GTC	ATC	ACC	990
Glu	Met	Ile	Val	Tyr	Lys	Ala	Pro	Gln	Glu	Lys	His	Val	Ile	Thr	
			80					85					90		
GTG	TTT	ACT	GAT	ATT	ACC	TGT	GGT	TAC	TGC	CAC	AAA	CTG	CAT	GAG	1035
Val	Phe	Thr	Asp	Ile	Thr	Cys	Gly	Tyr	Cys	His	Lys	Leu	His	Glu	
			95					100					105		
CAA	ATG	GCA	GAC	TAC	AAC	GCG	CTG	GGG	ATC	ACC	GTG	CGT	TAT	CTT	1080
Gln	Met	Ala	Asp	Tyr	Asn	Ala	Leu	Gly	Ile	Thr	Val	Arg	Tyr	Leu	
			110					115					120		
GCT	TTC	CCG	CGC	CAG	GGG	CTG	GAC	AGC	GAT	GCA	GAG	AAA	GAA	ATG	1125
Ala	Phe	Pro	Arg	Gln	Gly	Leu	Asp	Ser	Asp	Ala	Glu	Lys	Glu	Met	
			125					130					135		
AAA	GCT	ATC	TGG	TGT	GCG	AAA	GAT	AAA	AAC	AAA	GCG	TTT	GAT	GAT	1170
Lys	Ala	Ile	Trp	Cys	Ala	Lys	Asp	Lys	Asn	Lys	Ala	Phe	Asp	Asp	
			140					145					150		
GTG	ATG	GCA	GGT	AAA	AGC	GTC	GCA	CCA	GCC	AGT	TGC	GAC	GTG	GAT	1215
Val	Met	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	Ala	Ser	Cys	Asp	Val	Asp	
			155					160					165		
ATT	GCC	GAC	CAT	TAC	GCA	CTT	GGC	GTC	CAG	CTT	GGC	GTT	AGC	GGT	1260
Ile	Ala	Asp	His	Tyr	Ala	Leu	Gly	Val	Gln	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	
			170					175					180		
ACT	CCG	GCA	GTT	GTG	CTG	AGC	AAT	GGC	ACA	CTT	GTT	CCG	GGT	TAC	1305
Thr	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Gly	Tyr	
			185					190					195		
CAG	CCG	CCG	AAA	GAG	ATG	AAA	GAA	TTC	CTC	GAC	GAA	CAC	CAA	AAA	1350
Gln	Pro	Pro	Lys	Glu	Met	Lys	Glu	Phe	Leu	Asp	Glu	His	Gln	Lys	
			200					205					210		
ATG	ACC	AGC	GGT	AAA	TAATTCGCGT	AGCTT									1380
Met	Thr	Ser	Gly	Lys											
			215												

ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2009 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP27

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (23..85)

08.08.99

- 63 -

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (86..1999)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Alkalischer Phosphatase,
Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala, Mutein DigA16
und Strep-tag II"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (86..1435)

SONSTIGE ANGABEN:

/PRODUKT="maturer Teil der Alkalischen Phosphatase"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1436..1447)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Verbindungspeptid Pro-Pro-Ser-Ala"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1448..1969)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Mutein DigA16"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (1970..1999)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

TCTAGAACAT	GGAGAAAATA	AA	GTG	AAA	CAA	AGC	ACT	ATT	GCA	CTG		46			
			Val	Lys	Gln	Ser	Thr	Ile	Ala	Leu					
			-21	-20						-15					
CA	CTC	TTA	CCG	TTA	CTG	TTT	ACC	CCT	GTG	ACA	AAA	GCC	CGG	ACA	91
Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Ala	Arg	Thr	
			-10				-5				-1	1			
CCA	GAA	ATG	CCT	GTT	CTG	GAA	AAC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	136
Pro	Glu	Met	Pro	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	
		5					10					15			
ACT	GCA	CCC	GGC	GGT	GCT	CGC	CGT	TTA	ACG	GGT	GAT	CAG	ACT	GCC	181
Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	
		20					25					30			
GCT	CTG	CGT	GAT	TCT	CTT	AGC	GAT	AAA	CCT	GCA	AAA	AAT	ATT	ATT	226
Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	
		35					40					45			
TTG	CTG	ATT	GGC	GAT	GGG	ATG	GGG	GAC	TCG	GAA	ATT	ACT	GCC	GCA	271
Leu	Leu	Ile	Gly	Asp	Gly	Met	Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	
		50					55					60			

CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC GGC TTT TTT AAA GGT ATA GAT 316
Arg Asn Tyr Ala Glu Gly Ala Gly Gly Phe Phe Lys Gly Ile Asp
65 70 75

GCC TTA CCG CTT ACC GGG CAA TAC ACT CAC TAT GCG CTG AAT AAA 361
Ala Leu Pro Leu Thr Gly Gln Tyr Thr His Tyr Ala Leu Asn Lys
80 85 90

AAA ACC GGC AAA CCG GAC TAC GTC ACC GAC TCG GCT GCA TCA GCA 406
Lys Thr Gly Lys Pro Asp Tyr Val Thr Asp Ser Ala Ala Ser Ala
95 100 105

ACC GCC TGG TCA ACC GGT GTC AAA ACC TAT AAC GGC GCG CTG GGC 451
Thr Ala Trp Ser Thr Gly Val Lys Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Gly
110 115 120

GTC GAT ATT CAC GAA AAA GAT CAC CCA ACG ATT CTG GAA ATG GCA 496
Val Asp Ile His Glu Lys Asp His Pro Thr Ile Leu Glu Met Ala
125 130 135

AAA	GCC	GCA	GGT	CTG	GCG	ACC	GGT	AAC	GTT	TCT	ACC	GCA	GAG	TTG	541
Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	
		140					145					150			

CAG GAT GCC ACG CCC GCT GCG CTG GTG GCA CAT GTG ACC TCG CGC 586
Gln Asp Ala Thr Pro Ala Ala Leu Val Ala His Val Thr Ser Arg
155 160 165

AAA TGC TAC GGT CCG AGC GCG ACC AGT GAA AAA TGT CCG GGT AAC 631
Lys Cys Tyr Gly Pro Ser Ala Thr Ser Glu Lys Cys Pro Gly Asn
170 175 180

GCT CTG GAA AAA GGC GGA AAA GGA TCG ATT ACC GAA CAG CTG CTT 676
Ala Leu Glu Lys Gly Gly Lys Gly Ser Ile Thr Glu Gln Leu Leu
185 190 195

AAC GCT CGT GCC GAC GTT ACG CTT GGC GGC GGC GCA AAA ACC TTT 721
sn Ala Arg Ala Asp Val Thr Leu Gly Gly Gly Ala Lys Thr Phe
200 205 210

GCT GAA ACG GCA ACC GCT GGT GAA TGG CAG GGA AAA ACG CTG CGT 766
Ala Glu Thr Ala Thr Ala Gly Glu Trp Gln Gly Lys Thr Leu Arg
215 220 225

GAA CAG GCA CAG GCG CGT GGT TAT CAG TTG GTG AGC GAT GCT GCC 811
Glu Gln Ala Gln Ala Arg Gly Tyr Gln Leu Val Ser Asp Ala Ala
230 235 240

TCA CTG AAT TCG GTG ACG GAA GCG AAT CAG CAA AAA CCC CTG CTT 856
Ser Leu Asn Ser Val Thr Glu Ala Asn Gln Gln Lys Pro Leu Leu
245 250 255

GGC CTG TTT GCT GAC GGC AAT ATG CCA GTG CGC TGG CTA GGA CCG 901
Gly Leu Phe Ala Asp Gly Asn Met Pro Val Arg Trp Leu Gly Pro
260 265 270



AAA	GCA	ACG	TAC	CAT	GGC	AAT	ATC	GAT	AAG	CCC	GCA	GTC	ACC	TGT	946
Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	Asn	Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	
		275					280					285			
ACG	CCA	AAT	CCG	CAA	CGT	AAT	GAC	AGT	GTA	CCA	ACC	CTG	GCG	CAG	991
Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	Asp	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Ala	Gln	
		290					295					300			
ATG	ACC	GAC	AAA	GCC	ATT	GAA	TTG	TTG	AGT	AAA	AAT	GAG	AAA	GGC	1036
Met	Thr	Asp	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Lys	Gly	
		305					310					315			
TTT	TTC	CTG	CAA	GTT	GAA	GGT	GCG	TCA	ATC	GAT	AAA	CAG	GAT	CAT	1081
Phe	Phe	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ala	Ser	Ile	Asp	Lys	Gln	Asp	His	
		320					325					330			
GCT	GCG	AAT	CCT	TGT	GGG	CAA	ATT	GGC	GAG	ACG	GTC	GAT	CTC	GAT	1126
Ala	Ala	Asn	Pro	Cys	Gly	Gln	Ile	Gly	Glu	Thr	Val	Asp	Leu	Asp	
		335					340					345			
GAA	GCC	GTA	CAA	CGG	GCG	CTG	GAA	TTC	GCT	AAA	AAG	GAG	GGT	AAC	1171
Glu	Ala	Val	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	Lys	Glu	Gly	Asn	
		350					355					360			
ACG	CTG	GTC	ATA	GTC	ACC	GCT	GAT	CAC	GCC	CAC	GCC	AGC	CAG	ATT	1216
Thr	Leu	Val	Ile	Val	Thr	Ala	Asp	His	Ala	His	Ala	Ser	Gln	Ile	
		365					370					375			
GTT	GCG	CCG	GAT	ACC	AAA	GCT	CCG	GGC	CTC	ACC	CAG	GCG	CTA	AAT	1261
Val	Ala	Pro	Asp	Thr	Lys	Ala	Pro	Gly	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Asn	
		380					385					390			
ACC	AAA	GAT	GGC	GCA	GTG	ATG	GTG	ATG	AGT	TAC	GGG	AAC	TCC	GAA	1306
Thr	Lys	Asp	Gly	Ala	Val	Met	Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Asn	Ser	Glu	
		395					400					405			
GAG	GAT	TCA	CAA	GAA	CAT	ACC	GGC	AGT	CAG	TTG	CGT	ATT	GCG	GCG	1351
Glu	Asp	Ser	Gln	Glu	His	Thr	Gly	Ser	Gln	Leu	Arg	Ile	Ala	Ala	
		410					415					420			
TAT	GGC	CCG	CAT	GCC	GCC	AAT	GTT	GTT	GGA	CTG	ACC	GAC	CAG	ACC	1396
Tyr	Gly	Pro	His	Ala	Ala	Asn	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Asp	Gln	Thr	
		425					430					435			
GAT	CTC	TTC	TAC	ACC	ATG	AAA	GCC	GCT	CTG	GGG	CTG	AAA	CCG	CCT	1441
Asp	Leu	Phe	Tyr	Thr	Met	Lys	Ala	Ala	Leu	Gly	Leu	Lys	Pro	Pro	
		440					445					450			
AGC	GCT	GAC	GTG	TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	1486
Ser	Ala	Asp	Val	Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	
		455					460					465			
GTC	GAC	AAC	TTC	GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	CAG	1531
Val	Asp	Asn	Phe	Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Gln	
		470					475					480			



GTC	GCC	GCG	TAC	CCC	GAT	CAT	ATT	ACG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	1576
Val	Ala	Ala	Tyr	Pro	Asp	His	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	
		485					490					495			
TGG	GCT	GAG	TAC	ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	1621
Trp	Ala	Glu	Tyr	Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	
		500					505					510			
TAC	TCT	GTA	ATC	CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	1666
Tyr	Ser	Val	Ile	His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	
		515					520					525			
TAC	CCA	GTT	GGT	GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	TAC	1711
Tyr	Pro	Val	Gly	Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Tyr	
		530					535					540			
ACT	ATT	GGA	GGT	GTG	ACC	CAG	GAG	GGT	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	1756
Thr	Ile	Gly	Gly	Val	Thr	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	
		545					550					555			
ACT	GAC	AAC	AAG	AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TTT	TGC	TCG	TAC	GAC	1801
Thr	Asp	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Tyr	Asp	
		560					565					570			
GAG	GAC	AAG	AAG	GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	1846
Glu	Asp	Lys	Lys	Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	
		575					580					585			
AGC	ATG	GTC	CTT	ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	1891
Ser	Met	Val	Leu	Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	
		590					595					600			
CTT	ATC	GGC	TCC	CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	1936
Leu	Ile	Gly	Ser	Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	
		605					610					615			
GAC	TTC	TCT	GAA	GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	1981
sp	Phe	Ser	Glu	Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	
		620					625					630			
CAC	CCG	CAG	TTC	GAA	AAA	TAATAAGCTT									2009
His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys										
		635													

ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 2005 Basenpaare

ART: Nucleinsäure

STRANGFORM: Doppelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Fragment des Plasmids pBBP29

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: Signalpeptid

LAGE: (22..84)

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

LAGE: (85..1998)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Fusionsprotein aus Mutein DigA16, Strep-tag II,
Verbindungspeptid Gly(5) und Alkalischer
Phosphatase"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (85..606)

SONSTIGE ANGABEN:

/PRODUKT="Mutein DigA16"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (607..636)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Strep-tag II-Affinitätsanhängsel"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (637..651)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Verbindungspeptid Gly-Gly-Gly-Gly-Gly"

MERKMAL:

NAME/SCHLÜSSEL: codierende Sequenz

LAGE: (652..1998)

SONSTIGE ANGABEN:

/Produkt="Alkalische Phosphatase ohne Signalsequenz und N-
terminales Arg"

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

TCTAGATAAC	GAGGGCAAAA	A	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT							45
			Met	Lys	Lys	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile							
			-21	-20					-15								
GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	GAC	GTG			90
Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Ala	Thr	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Val			
			-10					-5				-1	1				
TAC	CAC	GAC	GGT	GCC	TGT	CCC	GAA	GTC	AAG	CCA	GTC	GAC	AAC	TTC			135
Tyr	His	Asp	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Val	Lys	Pro	Val	Asp	Asn	Phe			
		5					10					15					
GAC	TGG	TCC	CAG	TAC	CAT	GGT	AAA	TGG	TGG	CAG	GTC	GCC	GCG	TAC			180
Asp	Trp	Ser	Gln	Tyr	His	Gly	Lys	Trp	Trp	Gln	Val	Ala	Ala	Tyr			
		20					25					30					
CCC	GAT	CAT	ATT	ACG	AAG	TAC	GGA	AAG	TGC	GGA	TGG	GCT	GAG	TAC			225
Pro	Asp	His	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Lys	Cys	Gly	Trp	Ala	Glu	Tyr			
		35					40					45					
ACT	CCT	GAA	GGC	AAG	AGT	GTC	AAA	GTT	TCG	CGC	TAC	TCT	GTA	ATC			270
Thr	Pro	Glu	Gly	Lys	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile			
		50					55					60					

CAC	GGC	AAG	GAA	TAC	TTT	TCC	GAA	GGT	ACC	GCC	TAC	CCA	GTT	GGT	315
His	Gly	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Pro	Val	Gly	
		65					70					75			
GAC	TCC	AAG	ATT	GGA	AAG	ATC	TAC	CAC	AGC	TAC	ACT	ATT	GGA	GGT	360
Asp	Ser	Lys	Ile	Gly	Lys	Ile	Tyr	His	Ser	Tyr	Thr	Ile	Gly	Gly	
		80					85					90			
GTG	ACC	CAG	GAG	GGT	GTA	TTC	AAC	GTA	CTC	TCC	ACT	GAC	AAC	AAG	405
Val	Thr	Gln	Glu	Gly	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	
		95					100					105			
AAC	TAC	ATC	ATC	GGA	TAC	TTT	TGC	TCG	TAC	GAC	GAG	GAC	AAG	AAG	450
Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Tyr	Phe	Cys	Ser	Tyr	Asp	Glu	Asp	Lys	Lys	
		110					115					120			
GGA	CAC	ATG	GAC	TTG	GTC	TGG	GTG	CTC	TCC	AGA	AGC	ATG	GTC	CTT	495
Gly	His	Met	Asp	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ser	Arg	Ser	Met	Val	Leu	
		125					130					135			
ACT	GGT	GAA	GCC	AAG	ACC	GCT	GTC	GAG	AAC	TAC	CTT	ATC	GGC	TCC	540
Thr	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Leu	Ile	Gly	Ser	
		140					145					150			
CCA	GTA	GTC	GAC	TCC	CAG	AAA	CTG	GTA	TAC	AGT	GAC	TTC	TCT	GAA	585
Pro	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Val	Tyr	Ser	Asp	Phe	Ser	Glu	
		155					160					165			
GCC	GCC	TGC	AAG	GTC	AAC	AAT	AGC	AAC	TGG	TCT	CAC	CCG	CAG	TTC	630
Ala	Ala	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Ser	Asn	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	
		170					175					180			
GAA	AAA	GGT	GGC	GGC	GGT	GGT	ACA	CCA	GAA	ATG	CCT	GTT	CTG	GAA	675
Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	Met	Pro	Val	Leu	Glu	
		185					190					195			
AC	CGG	GCT	GCT	CAG	GGC	GAT	ATT	ACT	GCA	CCC	GGC	GGT	GCT	CGC	720
Asn	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Ile	Thr	Ala	Pro	Gly	Gly	Ala	Arg	
		200					205					210			
CGT	TTA	ACG	GGT	GAT	CAG	ACT	GCC	GCT	CTG	CGT	GAT	TCT	CTT	AGC	765
Arg	Leu	Thr	Gly	Asp	Gln	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Ser	Leu	Ser	
		215					220					225			
GAT	AAA	CCT	GCA	AAA	AAT	ATT	ATT	TTG	CTG	ATT	GGC	GAT	GGG	ATG	810
Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Leu	Ile	Gly	Asp	Gly	Met	
		230					235					240			
GGG	GAC	TCG	GAA	ATT	ACT	GCC	GCA	CGT	AAT	TAT	GCC	GAA	GGT	GCG	855
Gly	Asp	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Ala	Arg	Asn	Tyr	Ala	Glu	Gly	Ala	
		245					250					255			
GGC	GGC	TTT	TTT	AAA	GGT	ATA	GAT	GCC	TTA	CCG	CTT	ACC	GGG	CAA	900
Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Gly	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Gln	
		260					265					270			



TAC	ACT	CAC	TAT	GCG	CTG	AAT	AAA	AAA	ACC	GGC	AAA	CCG	GAC	TAC	945
Tyr	Thr	His	Tyr	Ala	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Lys	Pro	Asp	Tyr	
		275					280					285			
GTC	ACC	GAC	TCG	GCT	GCA	TCA	GCA	ACC	GCC	TGG	TCA	ACC	GGT	GTC	990
Val	Thr	Asp	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Thr	Gly	Val	
		290					295					300			
AAA	ACC	TAT	AAC	GGC	GCG	CTG	GGC	GTC	GAT	ATT	CAC	GAA	AAA	GAT	1035
Lys	Thr	Tyr	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	His	Glu	Lys	Asp	
		305					310					315			
CAC	CCA	ACG	ATT	CTG	GAA	ATG	GCA	AAA	GCC	GCA	GGT	CTG	GCG	ACC	1080
His	Pro	Thr	Ile	Leu	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Thr	
		320					325					330			
GGT	AAC	GTT	TCT	ACC	GCA	GAG	TTG	CAG	GAT	GCC	ACG	CCC	GCT	GCG	1125
Gly	Asn	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Gln	Asp	Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	
		335					340					345			
CTG	GTG	GCA	CAT	GTG	ACC	TCG	CGC	AAA	TGC	TAC	GGT	CCG	AGC	GCG	1170
Leu	Val	Ala	His	Val	Thr	Ser	Arg	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ala	
		350					355					360			
ACC	AGT	GAA	AAA	TGT	CCG	GGT	AAC	GCT	CTG	GAA	AAA	GGC	GGA	AAA	1215
Thr	Ser	Glu	Lys	Cys	Pro	Gly	Asn	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Lys	
		365					370					375			
GGA	TCG	ATT	ACC	GAA	CAG	CTG	CTT	AAC	GCT	CGT	GCC	GAC	GTT	ACG	1260
Gly	Ser	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	
		380					385					390			
CTT	GGC	GGC	GGC	GCA	AAA	ACC	TTT	GCT	GAA	ACG	GCA	ACC	GCT	GGT	1305
Leu	Gly	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Phe	Ala	Glu	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	
		395					400					405			
GAA	TGG	CAG	GGA	AAA	ACG	CTG	CGT	GAA	CAG	GCA	CAG	GCG	CGT	GGT	1350
Glu	Trp	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala	Gln	Ala	Arg	Gly	
		410					415					420			
TAT	CAG	TTG	GTG	AGC	GAT	GCT	GCC	TCA	CTG	AAT	TCG	GTG	ACG	GAA	1395
Tyr	Gln	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Glu	
		425					430					435			
GCG	AAT	CAG	CAA	AAA	CCC	CTG	CTT	GGC	CTG	TTT	GCT	GAC	GGC	AAT	1440
Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Ala	Asp	Gly	Asn	
		440					445					450			
ATG	CCA	GTG	CGC	TGG	CTA	GGA	CCG	AAA	GCA	ACG	TAC	CAT	GGC	AAT	1485
Met	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Tyr	His	Gly	Asn	
		455					460					465			
ATC	GAT	AAG	CCC	GCA	GTC	ACC	TGT	ACG	CCA	AAT	CCG	CAA	CGT	AAT	1530
Ile	Asp	Lys	Pro	Ala	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Gln	Arg	Asn	
		470					475					480			

08.08.99

71

- 70 -

GAC AGT GTA CCA ACC CTG GCG CAG ATG ACC GAC AAA GCC ATT GAA 1575
 Asp Ser Val Pro Thr Leu Ala Gln Met Thr Asp Lys Ala Ile Glu
 485 490 495

TTG TTG AGT AAA AAT GAG AAA GGC TTT TTC CTG CAA GTT GAA GGT 1620
 Leu Leu Ser Lys Asn Glu Lys Gly Phe Phe Leu Gln Val Glu Gly
 500 505 510

GCG TCA ATC GAT AAA CAG GAT CAT GCT GCG AAT CCT TGT GGG CAA 1665
 Ala Ser Ile Asp Lys Gln Asp His Ala Ala Asn Pro Cys Gly Gln
 515 520 525

ATT GGC GAG ACG GTC GAT CTC GAT GAA GCC GTA CAA CGG GCG CTG 1710
 Ile Gly Glu Thr Val Asp Leu Asp Glu Ala Val Gln Arg Ala Leu
 530 535 540

GAA TTC GCT AAA AAG GAG GGT AAC ACG CTG GTC ATA GTC ACC GCT 1755
 Glu Phe Ala Lys Lys Glu Gly Asn Thr Leu Val Ile Val Thr Ala
 545 550 555

GAT CAC GCC CAC GCC AGC CAG ATT GTT GCG CCG GAT ACC AAA GCT 1800
 Asp His Ala His Ala Ser Gln Ile Val Ala Pro Asp Thr Lys Ala
 560 565 570

CCG GGC CTC ACC CAG GCG CTA AAT ACC AAA GAT GGC GCA GTG ATG 1845
 Pro Gly Leu Thr Gln Ala Leu Asn Thr Lys Asp Gly Ala Val Met
 575 580 585

GTG ATG AGT TAC GGG AAC TCC GAA GAG GAT TCA CAA GAA CAT ACC 1890
 Val Met Ser Tyr Gly Asn Ser Glu Glu Asp Ser Gln Glu His Thr
 590 595 600

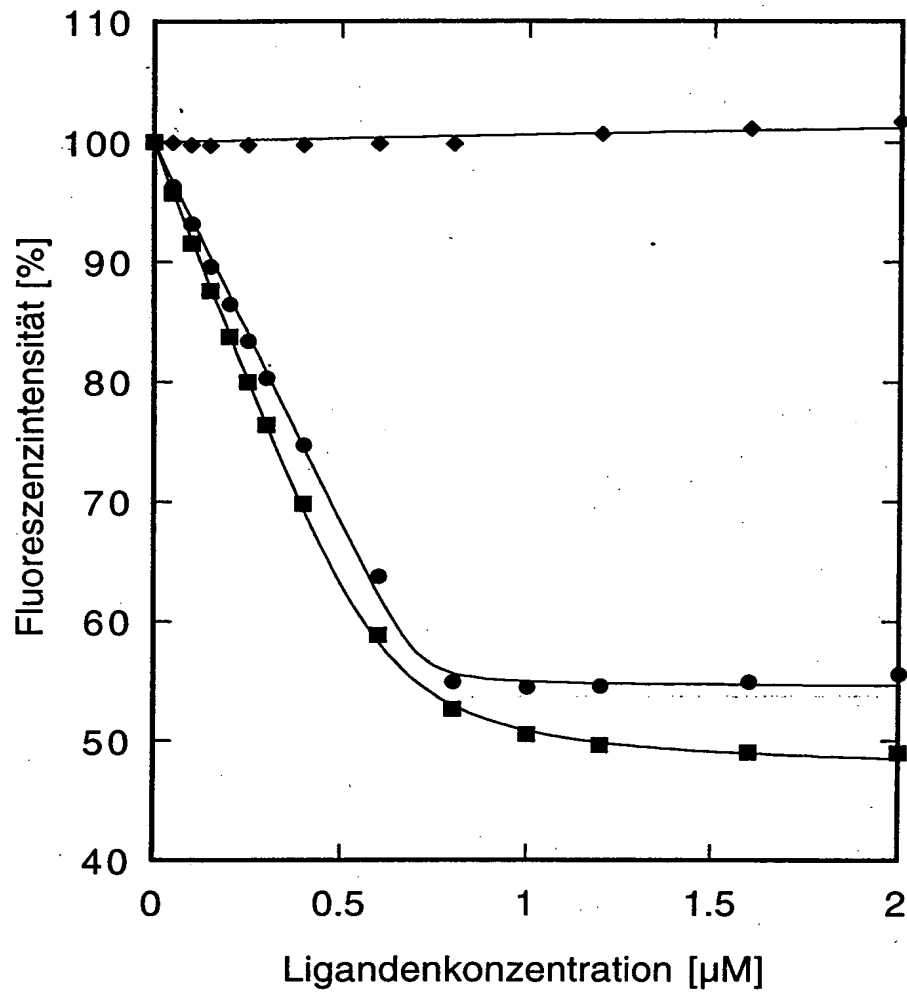
GGC AGT CAG TTG CGT ATT GCG GCG TAT GGC CCG CAT GCC GCC AAT 1935
 Gly Ser Gln Leu Arg Ile Ala Ala Tyr Gly Pro His Ala Ala Asn
 605 610 615

GTT GTT GGA CTG ACC GAC CAG ACC GAT CTC TTC TAC ACC ATG AAA 1980
 Val Val Gly Leu Thr Asp Gln Thr Asp Leu Phe Tyr Thr Met Lys
 620 625 630

GCC GCT CTG GGG CTG AAA TAAGCTT 2005
 Ala Ala Leu Gly Leu Lys
 635

08.06.99

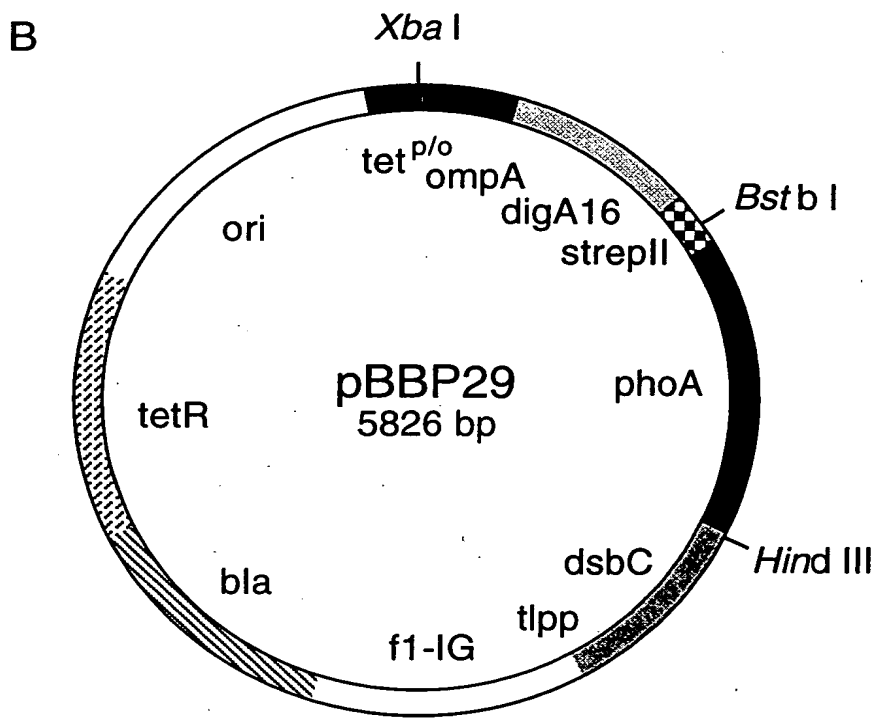
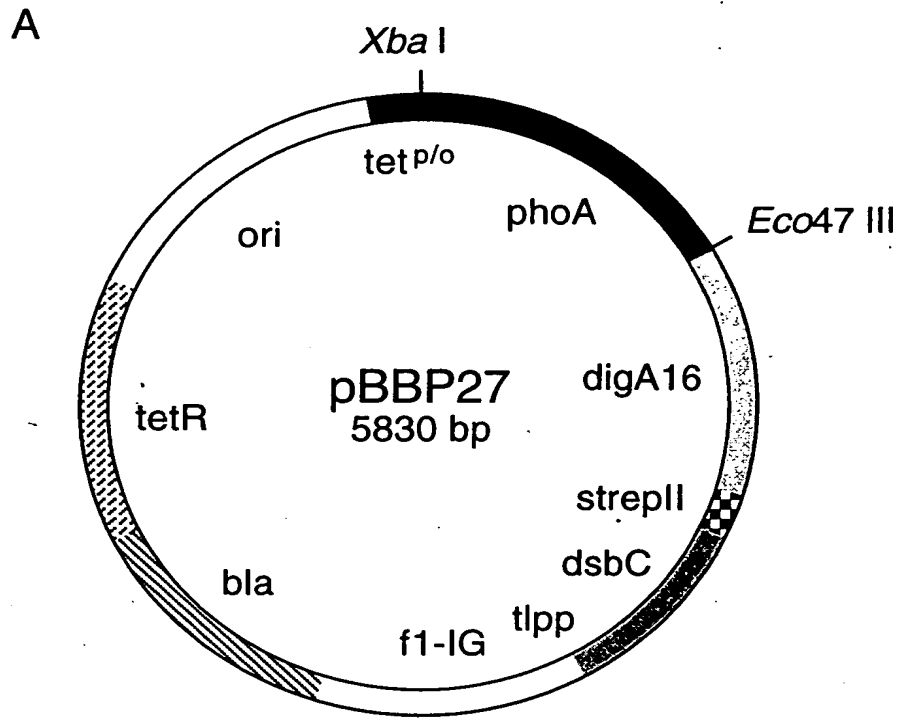
74



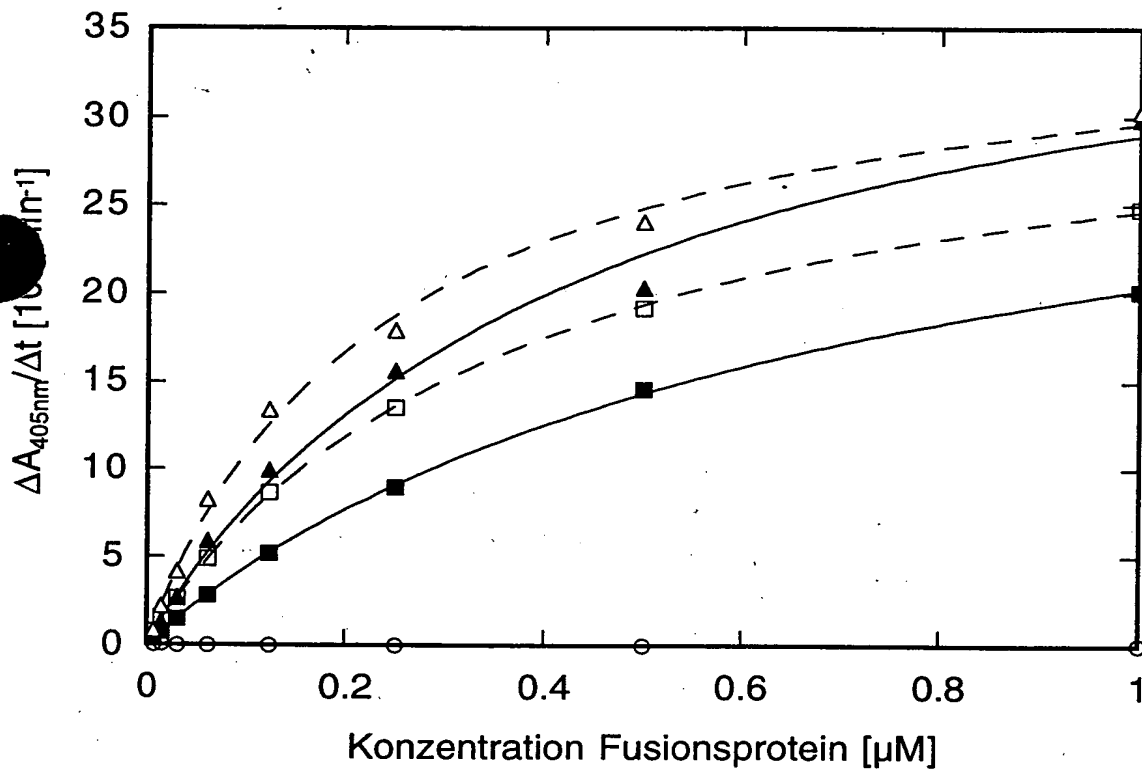
Figur 1

08.08.99

15



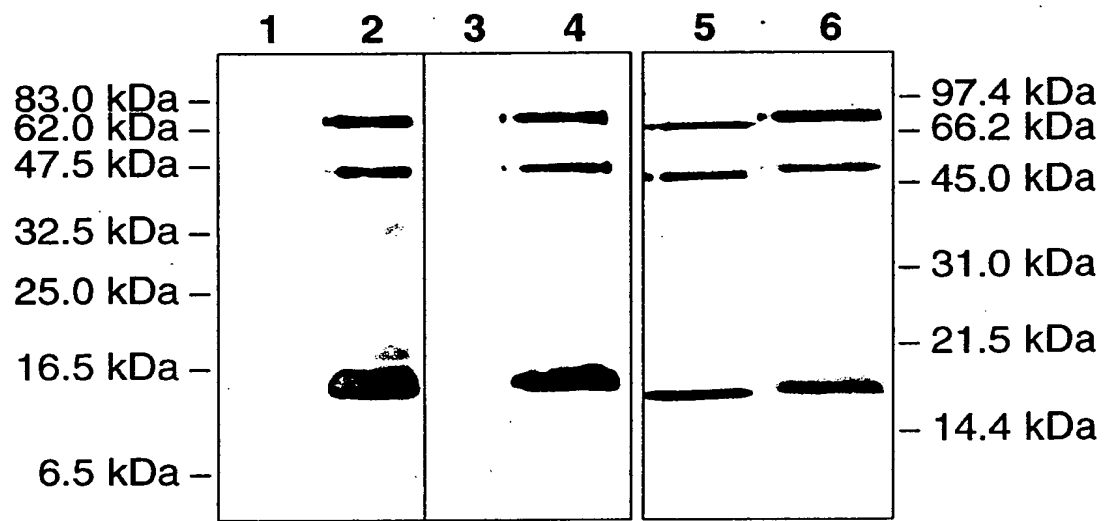
Figur 2



Figur 3

08.05.99

77



Figur 4